

Université de Montréal

**Purification par affinité et marquage isotopique
spécifique pour études d'ARN fonctionnels**

par

Pierre Dagenais

Département de biochimie

Faculté de Médecine

Mémoire présenté à la Faculté de médecine

en vue de l'obtention du grade de M.Sc.

en biochimie

option biologie structurale

Août, 2012

© Pierre Dagenais, 2012

Université de Montréal
Faculté des études supérieures et postdoctorales

Ce mémoire intitulé :

Purification par affinité et marquage isotopique spécifique pour études d'ARN fonctionnels

Présenté par :
Pierre Dagenais

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Normand Brisson, président-rapporteur
Pascale Legault, directrice de recherche
Daniel Zenklusen, membre du jury

Résumé

Il existe un lien étroit entre la structure tridimensionnelle et la fonction cellulaire de l'ARN. Il est donc essentiel d'effectuer des études structurales de molécules d'ARN telles que les riborégulateurs afin de mieux caractériser leurs mécanismes d'action. Une technique de choix, permettant d'obtenir de l'information structurale sur les molécules d'ARN est la spectroscopie RMN. Cette technique est toutefois limitée par deux difficultés majeures. Premièrement, la préparation d'une quantité d'ARN nécessaire à ce type d'étude est un processus long et ardu. Afin de résoudre ce problème, notre laboratoire a développé une technique rapide de purification des ARN par affinité, utilisant une étiquette ARiBo. La deuxième difficulté provient du grand recouvrement des signaux présents sur les spectres RMN de molécules d'ARN. Ce recouvrement est proportionnel à la taille de la molécule étudiée, rendant la détermination de structures d'ARN de plus de 15 kDa extrêmement complexe. La solution émergente à ce problème est le marquage isotopique spécifique des ARN. Cependant, les protocoles élaborés jusqu'à maintenant sont très coûteux, requièrent plusieurs semaines de manipulation en laboratoire et procurent de faibles rendements.

Ce mémoire présente une nouvelle stratégie de marquage isotopique spécifique d'ARN fonctionnels basée sur la purification par affinité ARiBo. Cette approche comprend la séparation et la purification de nucléotides marqués, une ligation enzymatique sur support solide, ainsi que la purification d'ARN par affinité sans restriction de séquence. La nouvelle stratégie développée permet un marquage isotopique rapide et efficace d'ARN fonctionnels et devrait faciliter la détermination de structures d'ARN de grandes tailles par spectroscopie RMN.

Mots-clés : Ribonucléoside monophosphate (NMP), séparation de NMP, ARN, purification par affinité, marquage isotopique, résonance magnétique nucléaire (RMN).

Abstract

The tridimensional structure of a given RNA molecule is closely linked to its cellular function. For this reason, it is crucial to study the structure of RNA molecules, such as riboswitches, to characterize their mechanism of action. To do so, NMR spectroscopy is often used to gather structural data on RNA molecules in solution. However, this approach is limited by two main difficulties. First, the production of preparative quantities of natively folded and purified RNA molecules is a long and tedious process. To facilitate this step, our laboratory has developed an RNA-affinity purification method using an ARiBo tag. The second limiting step comes from the extensive signal overlap detected on NMR spectra of large RNA molecules. This overlap is proportional to the length of the RNA, which often prevents high-resolution structure determination of RNAs larger than 15 kDa. To solve this problem, specific isotopic labeling of RNAs can now be achieved. However, existing labeling protocols are expensive, require several weeks of laboratory manipulations and usually provide relatively low yields.

This thesis provides an alternative strategy to achieve specific isotopic labeling of RNA molecules, based on the ARiBo tag affinity purification technique. The protocol includes the separation and the purification of isotopically labeled nucleotides, an enzymatic ligation step performed on a solid support and the affinity purification of the RNA of interest, without any sequence restriction. This new strategy is a fast and efficient way to label functional RNAs isotopically and should facilitate NMR structure determination of large RNAs.

Keywords : Ribonucleoside monophosphate (NMP), NMP separation, RNA, affinity purification, isotopic-labeling, nuclear magnetic resonance (NMR).

Table des matières

Résumé.....	i
Abstract.....	ii
Table des matières.....	iii
Liste des tableaux.....	vii
Liste des figures.....	viii
Liste des abréviations.....	x
Remerciements.....	xii
1. Introduction.....	13
1.1. L'importance de l'ARN.....	13
1.2. Les riborégulateurs.....	14
1.2.1. Les riborégulateurs à purine.....	17
1.3. La résonance magnétique nucléaire.....	21
1.3.1. Études de RMN de macromolécules.....	21
1.3.2. RMN du mutant U65C du riborégulateur à adénine.....	23
1.3.3. Les limites de la RMN des ARN.....	25
1.3.4. Le marquage isotopique spécifique des ARN.....	26
1.4. La production de nucléotides marqués isotopiquement.....	29
1.4.1. La séparation de nucléosides marqués isotopiquement.....	30
1.4.1.1. La chromatographie en phase inverse avec pairage d'ions.....	32
1.5. La synthèse d'ARN.....	34
1.5.1. La synthèse chimique d'ARN.....	34
1.5.2. La synthèse enzymatique d'ARN.....	36
1.6. La purification des ARN.....	39
1.6.1. La purification par électrophorèse sur gels dénaturants.....	39
1.6.2. La purification par chromatographie liquide.....	40
1.6.3. La purification par affinité.....	41
1.6.3.1. Le ribozyme <i>glmS</i>	46

1.7.	La ligation des ARN.....	48
1.7.1.	La ligation chimique des ARN.....	48
1.7.1.1.	Formation d'une liaison phosphodiester	48
1.7.1.2.	Formation d'une liaison non-naturelle	50
1.7.2.	La ligation enzymatique des ARN	52
1.7.2.1.	Utilisation de la ligase à ADN du phage T4.....	53
1.7.2.2.	Utilisation de la ligase à ARN 1 du phage T4.....	55
1.7.2.2.1.	Ligase à ARN 1 du phage T4 sans utilisation d'ADN d'appariement.....	56
1.7.2.2.2.	Ligase à ARN 1 du phage T4 avec utilisation d'ADN d'appariement.....	58
1.7.2.3.	Utilisation de la ligase à ARN 2 du phage T4.....	60
1.7.2.4.	Utilisation de ligases DNAzymes	61
1.8.	Hypothèses et objectifs du projet de recherche.....	62
2.	Matériels et méthodes	65
2.1.	Production des échantillons d'ARN.....	65
2.1.1.	Obtention des clones ARiBo1 contenant la séquence d'intérêt	65
2.1.2.	Transcription <i>in vitro</i> de l'ARN.....	65
2.2.	L'étiquette ARiBo	66
2.2.1.	Test de clivage de l'étiquette ARiBo	66
2.2.2.	Purification des ARN par affinité utilisant l'étiquette ARiBo	66
2.3.	Préparation de NMP marqués en ¹⁵ N.....	67
2.3.1.	Production d'un mélange de NMP marqué en ¹⁵ N.....	67
2.3.2.	Séparation et purification des NMP par HPLC.....	68
2.4.	Appariement et ligation d'ARN	68
2.4.1.	Quantification des fragments par densité optique	68
2.4.2.	Protection et déprotection des extrémités du fragment accepteur.....	69
2.4.3.	Formation des complexes de pré-ligation	70
2.4.3.1.	Tests d'appariement des complexes de pré-ligation	70
2.4.3.2.	Mise sur gel natif des complexes de pré-ligation.....	71
2.4.4.	Réactions de ligation enzymatique.....	71

2.4.4.1.	Ligation optimale catalysée par la ligase à ADN du phage T4.....	71
2.4.4.2.	Ligation optimale catalysée par la ligase à ARN 1 du phage T4.....	72
2.5.	Ligation sur support solide ARiBo	72
2.6.	Quantification d'ARN révélée au <i>SYBR Gold</i>	73
2.7.	Production et purification de la ligase à ARN 1 du phage T4	75
3.	Résultats	76
3.1.	Développement d'un protocole de séparation préparative des NMP.....	76
3.1.1.	Adaptation d'un protocole de séparation analytique des NMP.....	77
3.1.1.1.	Choix de l'agent de pairage ionique.....	77
3.1.1.2.	Optimisation de la séparation des quatre NMP	80
3.1.2.	Protocole de purification des NMP individuels par HPLC en phase inverse ...	85
3.1.3.	Contrôle de qualité des échantillons de NMP séparés	87
3.2.	Exploration de la séquence d'attache nécessaire au clivage de l'étiquette ARiBo	88
3.2.1.	Modifications de la séquence d'attache de l'étiquette ARiBo	89
3.3.	Jumelage de la synthèse enzymatique d'ARN, de la purification par étiquette ARiBo et de la ligation enzymatique.....	91
3.3.1.	Stratégie générale du marquage isotopique spécifique	92
3.3.2.	Purification par affinité du fragment accepteur.....	94
3.3.3.	Formation d'extrémités hydroxyles	96
3.3.4.	Formation des complexes de pré-ligation	98
3.3.4.1.	Complexe de pré-ligation servant à la ligase à ADN.....	98
3.3.4.2.	Complexe de pré-ligation servant à la ligase à ARN 1	100
3.3.5.	Optimisation de la ligation enzymatique du RSA.....	102
3.3.5.1.	Ligations effectuées en solution.....	102
3.3.5.2.	Ligation effectuée sur le support solide ARiBo	105
3.3.6.	Transcription du RSA3'-ARiBo utilisant le GMP ¹⁵ N obtenu par IP-HPLC.....	107

3.3.7.	Matériel nécessaire au marquage sélectif d'ARN utilisant l'étiquette ARiBo	108
3.3.7.1.	Production de ligase à ARN 1 du phage T4 en laboratoire	110
4.	Discussion	112
4.1.	Analyse du protocole de séparation des NMP par IP-HPLC	112
4.1.1.	Comparaison avec les méthodes de séparation de NMP déjà existantes	112
4.1.2.	Caractéristiques particulières du protocole de séparation des NMP	114
4.2.	Analyse de la séquence d'attache nécessaire au clivage de l'étiquette ARiBo	116
4.2.1.	Restrictions du clivage de l'étiquette ARiBo	116
4.2.2.	Élution rigoureuse et purification par affinité	117
4.3.	Analyse du marquage isotopique spécifique des ARN sur support ARiBo	118
4.3.1.	Incorporation du GMP ¹⁵ N	118
4.3.2.	Formation du complexe de pré-ligation	120
4.3.2.1.	Formation d'extrémités compatibles avec la ligation	120
4.3.2.2.	Formation de complexes ternaires.....	122
4.3.3.	Amélioration de la pureté de l'échantillon ligué.....	122
4.3.4.	Réduction des coûts du marquage spécifique sur support ARiBo	125
4.3.5.	Ligation sans support solide ARiBo	127
4.3.6.	Comparaison aux stratégies déjà existantes	130
5.	Conclusion.....	132
6.	Annexes.....	i
6.1.	Séquences des molécules d'ARN et d'ADN utilisées.....	i
7.	Bibliographie.....	iii

Liste des tableaux

Tableau I : Compilation du matériel nécessaire au marquage sélectif du résidu G39 du RSA.....	109
Tableau II : Matériel nécessaire au marquage sélectif d'un échantillon présentant un haut niveau de pureté.....	125

Liste des figures

Figure 1: Les différents types de riborégulateurs bactériens.

Figure 2: Structure secondaire des aptamères des riborégulateurs à purine.

Figure 3: Site de liaison du ligand chez les riborégulateurs à purine.

Figure 4 : Structures secondaires et spectres RMN des riborégulateurs à adénine sauvage et mutant U65C.

Figure 5 : Approche diviser pour régner.

Figure 6 : Marquage segmentaire des ARN.

Figure 7 : Séparation analytique de NMP par IP-HPLC.

Figure 8 : Synthèse chimique d'ARN.

Figure 9 : Stratégie permettant l'obtention d'extrémités 100 % homogènes par transcription enzymatique.

Figure 10 : Purification d'ARN par affinité sur colonne de nickel.

Figure 11 : Stratégie de purification d'ARN par affinité avec l'étiquette ARiBo.

Figure 12 : Ribozyme *glmS* et son site de clivage.

Figure 13 : Ligation chimique d'ARN avec ADN d'appariement.

Figure 14 : Liaisons covalentes non-naturelles introduites par ligations chimiques.

Figure 15 : Ligation d'ARN par ligase à ADN du phage T4.

Figure 16 : Ligase à ARN 1 du phage T4 sans l'utilisation d'ADN d'appariement.

Figure 17 : Ligase à ARN 1 du phage T4 avec l'utilisation d'un ADN d'appariement.

Figure 18 : Ligation d'ARN par DNAzymes.

Figure 19 : Séparation des NMP en utilisant différents agents de pairage ionique.

Figure 20 : Séparation préparative de NMP par IP-HPLC.

Figure 21 : Séparation des NMP en présence du tampon de digestion à la nucléase P1.

Figure 22 : Séparation préparative optimale d'un mélange de NMP par IP-HPLC.

Figure 23 : Purification de chacun des NMP par HPLC en phase inverse.

- Figure 24 : Contrôle de qualité des échantillons de NMP ^{15}N issus de la séparation par IP-HPLC.
- Figure 25 : Exigences de séquences d'attache au site de clivage de l'étiquette ARiBo.
- Figure 26 : Schéma global de la stratégie de marquage spécifique du RSA à l'aide de l'étiquette ARiBo.
- Figure 27: Clivage et purification du RSA5'-ARiBo.
- Figure 28 : Formation d'extrémités 3'-OH et 5'-OH par traitements enzymatiques.
- Figure 29 : Formation du complexe de pré-ligation entre le RSA3', le RSA5' et l'ADN d'appariement I.
- Figure 30 : Formation du complexe de pré-ligation entre le RSA3', le RSA5' et l'ADN d'appariement II.
- Figure 31 : Formation du RSA à l'aide de la ligase à ADN T4.
- Figure 32 : Formation du RSA-ARiBo à l'aide de la ligase à ARN 1 T4.
- Figure 33 : Ligation sur support solide à l'aide de l'étiquette ARiBo.
- Figure 34 : Transcription du RSA3'-ARiBo à partir de différents ratios de GMP.
- Figure 35 : Utilisation de la ligase à ARN 1 du phage T4 produite en laboratoire.
- Figure 36 : Stratégie de marquage spécifique optimale utilisant à la fois la purification par affinité ARiBo et les gels dénaturants.

Liste des abréviations

1D : Unidimensionnelle

2D : Bidimensionnelle

ADN : Acide désoxyribonucléique

ARN : Acide ribonucléique

ARNi : ARN interférent

ARNm : ARN messenger

ARNr : ARN ribosomal

ARNt : ARN de transfert

ATP : Adénosine triphosphate

CCM : Chromatographie sur couche mince

CiP : Phosphatase alcaline de veau

ddH₂O : Eau doublement distillée

DNAzyme : Enzyme à ADN

DTT : Dithiothréitol

FPLC : Chromatographie en phase liquide à performance rapide

GlcN6P : Glucosamine-6-phosphate

GSH : Glutathion

GST : Glutathion-S-Transférase

HDV : *Hepatitis Delta Virus*

HPLC : Chromatographie en phase liquide à haute performance

IP-HPLC : Chromatographie en phase liquide à haute performance en phase inverse, avec
pairage d'ions

IPR : Agents de pairage ionique (« *Ion Pairing Reagents* »)

K_d : Constante de dissociation

miARN : micro-ARN

NaAc : Acétate de sodium

nM : Nanomolaire

NMP : Nucléoside monophosphate

Nt : Nucléotide

NTP : Nucléoside triphosphate

pARNn : Petit ARN nucléaire

PDB : *Protein Data Bank*

PEG : polyéthylène glycol

pmole : picomole

RMN : Résonance magnétique nucléaire

RSA : Riborégulateur à adénine mutant U65C

SAM : *S*-adénosylméthionine

T4 PNK : Polynucléotide kinase du bactériophage T4

TBA : Tétrabutylammonium

TEABC : Bicarbonate de triéthylamine

T_f : Point de fusion

TPP : Thiamine pyrophosphate

VS : *Varkud Satellite*

μM : Micromolaire

Remerciements

Je tiens à remercier ma directrice de recherche, Pascale Legault, pour m'avoir encadré durant mes trois années de maîtrise. Grâce à ses idées et à ses commentaires constructifs, elle a grandement contribué à ma formation scientifique. Pascale m'a toujours encouragé à explorer mes idées et j'aimerais la remercier pour son soutien et sa disponibilité.

Je tiens aussi à remercier tous les membres des laboratoires Legault et Omichinski que j'ai côtoyé au cours des années, car ils ont tous contribué à leur façon à rendre cette expérience inoubliable. Plus particulièrement, un gros merci à Geneviève qui a agi comme mentor à mon arrivé au labo et qui continue encore aujourd'hui à me donner de petits conseils à chaque jour. Merci à Matthieu, Philippe, Thomas, Luca, Xavier, Jim, Dominique, Julie, Éric, Jonathan, Alix et Nico pour vos discussions et vos conseils sur des sujets scientifiques ou non. Vous m'avez souvent permis de ne pas devenir fou lorsque mon projet semblait impossible. Merci aussi à tous mes partenaires de squash, de racquetball et de volleyball, qui m'ont permis de me détendre après de longues journées de travail.

Je tiens aussi à remercier ma famille et mes amis pour leur soutien, même si vous ne comprenez pas toujours mon jargon scientifique. Un gros merci à Liah pour ses mots d'encouragement et sa compréhension lorsque je devais rentrer au labo tôt le matin, tard le soir ou parfois même durant la fin de semaine.

Finalement, j'aimerais remercier les Dr Brisson et Zenklusen pour avoir contribué à l'évaluation de mon mémoire, ainsi que les Instituts de Recherche en Santé du Canada pour le soutien financier qu'ils m'ont fournis au cours de mes études.

1. Introduction

1.1. L'importance de l'ARN

Selon le dogme central de la biologie moléculaire, l'information génétique permettant le développement et le fonctionnement de tout organisme vivant est conservée sous forme d'ADN. Cet ADN doit ensuite être transcrit en ARN, une forme transitoire qui permet la traduction en protéines. Ce sont les protéines qui, grâce à leurs structures complexes, jouent un rôle précis à l'intérieur des cellules. Les protéines sont donc responsables pour toutes les fonctions cellulaires (régulation de l'expression des gènes, activité catalytique, rôle structural, etc.). Cependant, depuis une trentaine d'années, plusieurs études ont démontré l'existence de différents types d'ARN, possédant des fonctions variées, impliqués dans plusieurs processus cellulaires fondamentaux, tels que la synthèse des protéines (ARNm, ARNr, ARNt) et le contrôle de l'expression des gènes (miARN, siARN, riborégulateurs). D'autres types d'ARN permettent de modifier des macromolécules par clivage (ribozymes, siARN), lors de l'épissage (pARNn) ou même en se liant à des protéines de façon spécifique. Ces études ont démontré que l'ARN ne sert pas simplement de messenger entre l'ADN et les protéines, mais possède aussi des fonctions spécifiques, cruciales au développement et au fonctionnement des organismes vivants.

Tout comme chez les protéines, il existe un lien étroit entre la structure tridimensionnelle et la fonction cellulaire des ARN. Cette relation est particulièrement importante chez les ARN qui adoptent différentes conformations selon leurs différents rôles cellulaires, comme c'est le cas pour les riborégulateurs.

1.2. Les riborégulateurs

Les riborégulateurs (« *riboswitch* ») sont des éléments de contrôle génétique généralement retrouvés à l'intérieur des régions 5' non-traduites des ARNm bactériens. Ces molécules d'ARN possèdent une structure complexe qui leur permet de lier un ligand spécifique (une petite molécule) avec une très forte affinité, sans l'aide d'intermédiaire protéique.

À ce jour, il existe plusieurs classes de riborégulateurs, répartis selon leur mode de liaison au ligand. Parmi les plus caractérisés, on retrouve le riborégulateur SAM (*S*-adénosylméthionine), le riborégulateur à thiamine pyrophosphate (TPP), les riborégulateurs à purine (guanine et adénine) et le riborégulateur *glmS* (Edwards and Ferre-D'Amare 2006; Klein and Ferre-D'Amare 2006; Montange and Batey 2006; Cochrane, Lipchock et al. 2007). Ces ARN sont généralement retrouvés directement en amont du gène qu'ils régulent et leur ligand est généralement un métabolite impliqué dans l'activité de la protéine encodée par cet ARNm. Par exemple, le riborégulateur à TPP est situé dans la région 5' non-traduite d'ARNm impliqués dans la biosynthèse de la thiamine (vitamine B1). La liaison d'une molécule de thiamine pyrophosphate à son riborégulateur engendre une inhibition de la traduction de l'ARNm et une interruption de la biosynthèse de la thiamine. Bref, lorsque la concentration intracellulaire en thiamine pyrophosphate est élevée, la production de son précurseur est inhibée par le riborégulateur (Winkler, Nahvi et al. 2002).

Structurellement, les riborégulateurs sont composés de deux unités distinctes: un aptamère et une plate-forme d'expression. L'aptamère forme un site de liaison pour un ligand spécifique, tandis que la plate-forme d'expression agit directement sur l'expression des gènes, soit au niveau de la transcription ou au niveau de la traduction. La liaison du ligand à l'aptamère engendre une réorganisation structurale du riborégulateur entier, ce qui permet à la plate-forme d'expression d'agir comme un interrupteur, en activant ou en

bloquant l'expression du gène cible (Figure 1). Afin de réguler l'expression au niveau transcriptionnel, le changement conformationnel provoqué par la liaison du ligand doit former (répression) ou démanteler (activation) une tige-boucle terminatrice, qui empêche l'ARN polymérase de continuer la synthèse de l'ARNm. La régulation au niveau de la traduction s'effectue selon le même principe, mais dans ce cas, la tige-boucle comprend le codon d'initiation de la traduction. La présence de cette tige-boucle vient alors séquestrer le codon d'initiation et empêche sa lecture par le ribosome, ce qui inhibe la traduction du gène associé au riborégulateur.

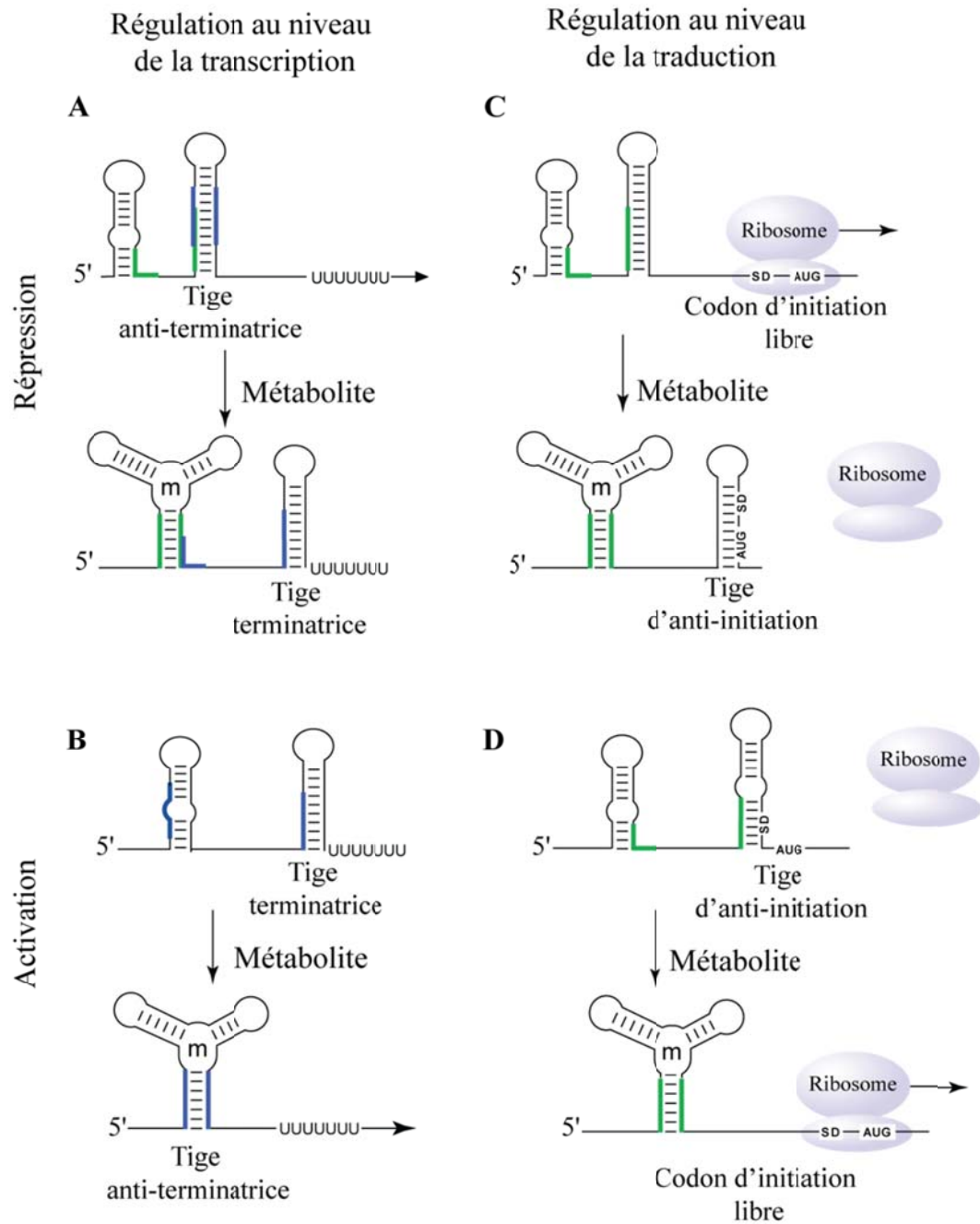


Figure 1: Les différents types de riborégulateurs bactériens.

Les riborégulateurs bactériens contrôlent l'expression des gènes au niveau de la transcription ou de la traduction. Dans chacun des cas, la liaison d'un métabolite à l'aptamère d'un riborégulateur engendre la formation d'une structure compacte, représentée

ici par une jonction à trois tiges. Cette nouvelle conformation engendre une réorganisation de la plate-forme d'expression, en permettant **(a)** ou en empêchant **(b)** la formation d'une tige terminatrice. La liaison du métabolite peut aussi inhiber **(c)** ou activer **(d)** la traduction via l'interaction du ribosome avec le codon d'initiation. Adapté de (Nudler and Mironov 2004).

Dès la découverte des riborégulateurs en 2002, plusieurs groupes de recherche ont tenté de déceler comment ces domaines d'ARNm régulent l'expression des gènes, et plus particulièrement quel mécanisme permet la reconnaissance d'un métabolite spécifique comme ligand. Afin de répondre à cette question, des études structurales et biochimiques ont été entreprises dans le but de caractériser les conformations des riborégulateurs en présence et en absence de ligand. Parmi ces études, celles portant sur la caractérisation des riborégulateurs à purine (adénine et guanine) est particulièrement d'intérêt, car ces deux riborégulateurs possèdent des structures secondaires très similaires et parviennent néanmoins à posséder une affinité spécifique pour l'adénine ou pour la guanine.

1.2.1. Les riborégulateurs à purine

Les riborégulateurs à purine sont présents dans la région 5' non-traduite d'ARNm bactérien, en amont de gènes régulant le métabolisme des purines. Par exemple, le riborégulateur à adénine *pbuE* de *Bacillus subtilis* contrôle l'expression d'une pompe à écoulement, permettant la sortie de l'adénine à l'extérieur de la cellule. En présence d'une concentration intracellulaire élevée en son ligand, l'adénine, le riborégulateur adopte une conformation compacte qui permet la synthèse de cette pompe à écoulement, ce qui provoque un rétablissement du niveau intracellulaire d'adénine.

Structuralement, la région de l'aptamère des riborégulateurs à purine forment une jonction à trois tiges comportant une interaction caractéristique de type pseudonœud entre les résidus des boucles P2 et P3. De plus, la composition en nucléotides de la région de l'aptamère chez les riborégulateurs à adénine et à guanine est presque identique, à l'exception d'un nucléotide clé dans la jonction entre les tiges P1 et P3 [Figure 2; (Mandal, Boese et al. 2003)].

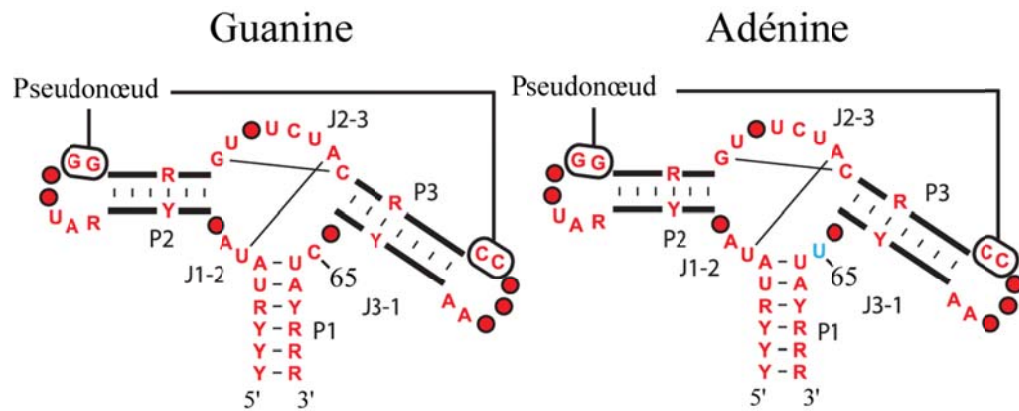


Figure 2: Structure secondaire des aptamères des riborégulateurs à purine.

Les séquences consensus des aptamères des riborégulateurs à guanine et à adénine sont représentées. Les nucléotides en rouge représentent des résidus conservés dans plus de 90 % des riborégulateurs à guanine découverts. Les points rouges représentent des nucléotides variables, les lettres R et Y représentent respectivement des purines et des pyrimidines, tandis que les tiges de longueurs variables sont représentées en noir. Le nucléotide en bleu, chez le riborégulateur à adénine, est différent de la séquence consensus du riborégulateur à guanine et permet la discrimination du ligand. Adapté de (Breaker 2011).

Malgré leur ressemblance structurale, les riborégulateurs à purines parviennent à distinguer leur substrat respectif. En effet, le riborégulateur à guanine lie la guanine avec une très forte affinité, comme le démontre sa constante de dissociation (K_d) de 5 nM, mais ne lie aucunement l'adénine ($K_d > 300 \mu\text{M}$). Pour sa part, le riborégulateur à adénine possède un K_d de 300 nM envers l'adénine, mais ne parvient pas à lier la guanine ($K_d > 100 \mu\text{M}$) (Mandal and Breaker 2004).

Des études structurales effectuées en présence de ligands ont donc été effectuées sur les aptamères de ces deux riborégulateurs, afin de déterminer les principes régulant la discrimination du ligand chez les riborégulateurs à adénine et à guanine (Serganov, Yuan et al. 2004; Gilbert, Stoddard et al. 2006). Ces études ont révélé la présence d'une structure tridimensionnelle très compacte chez l'aptamère, permettant d'engloutir le ligand à l'intérieur d'une jonction à 3 tiges, tant chez le riborégulateur à guanine que chez son homologue à adénine. Cette conformation structurale permet la reconnaissance de chacun des atomes de la purine, soit par la formation de ponts hydrogènes ou par des interactions Van der Waals avec l'aptamère du riborégulateur. De plus, la spécificité du ligand envers le riborégulateur est dictée par l'identité de la pyrimidine en position 65, qui forme une paire de base Watson-Crick avec le ligand [C65-Guanine chez le riborégulateur à guanine et U65-Adénine chez le riborégulateur à adénine; (Figure 3; (Serganov, Yuan et al. 2004))]. Afin de démontrer l'importance du résidu en position 65 pour la reconnaissance spécifique du ligand, un mutant C65U du riborégulateur à guanine a été conçu. Cette mutation ponctuelle provoque la conversion d'un riborégulateur à guanine en un riborégulateur liant l'adénine avec une forte affinité et spécificité (K_d : 470 nM), tout en abolissant son affinité pour la guanine.

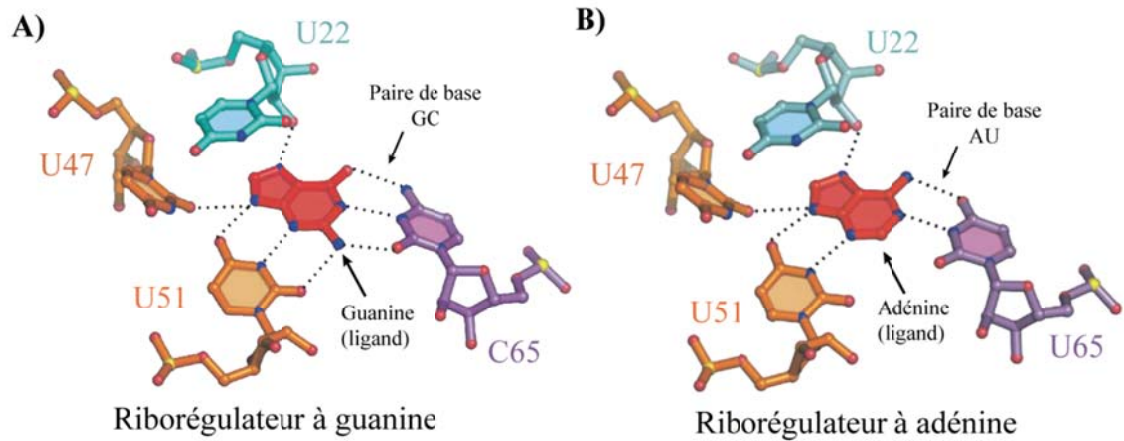


Figure 3: Site de liaison du ligand chez les riborégulateurs à purine.

A) Représentation des ponts hydrogènes formés entre le riborégulateur à guanine et son ligand, la guanine. Une fois liée, la guanine forme une paire de base Watson-Crick avec le résidu C65 du riborégulateur. **B)** Représentation des ponts hydrogènes formés entre le riborégulateur à adénine et son ligand, l'adénine. L'adénine liée forme une paire de base Watson-Crick avec le résidu U65 du riborégulateur. Adapté de (Serganov, Yuan et al. 2004).

Suite à cette étude, une conversion du riborégulateur à adénine de *B. subtilis* en riborégulateur liant la guanine a été testée en mutant le résidu U65 par une cytosine. Contrairement aux résultats attendus, ce mutant U65C du riborégulateur à adénine (RSA) n'a aucune affinité de liaison pour les purines [adénine, guanine ou 2-aminopurine; (Lemay and Lafontaine 2007)]. Afin d'expliquer ces résultats, des études mutationnelles et phylogénétiques ont permis d'établir une corrélation entre les résidus 39 et 65 des riborégulateurs à purine. Effectivement, seuls les nucléotides G, C et U à la position 39 du riborégulateur à adénine sont compatibles avec une liaison à l'adénine, tandis que seuls les nucléotides A, C et U à cette même position sur le riborégulateur à guanine sont compatibles avec une liaison à la guanine. Ainsi, les combinaisons A39-U65 et G39-C65 ne

permettent pas la liaison au ligand chez les riborégulateurs à purine. Afin d'accroître nos connaissances et de mieux comprendre la corrélation entre les résidus 39 et 65, des études structurales sur le riborégulateur à adénine mutant U65C de *B. subtilis* ont été entreprises dans notre laboratoire (Delfosse, Bouchard et al. 2010).

1.3. La résonance magnétique nucléaire

1.3.1. Études de RMN de macromolécules

La spectroscopie par résonance magnétique nucléaire (RMN) permet l'obtention de diverses données structurales de macromolécules, comme leurs interactions intermoléculaires, la valeur du pKa de certains groupes ionisables, la caractérisation de leur caractère dynamique et l'obtention de leur structure à haute résolution, en solution. Afin d'obtenir ces données, la spectroscopie RMN exploite le magnétisme des noyaux atomiques, en tirant profit d'une propriété intrinsèque des noyaux, leur spin nucléaire [I; (Lambert 2003)].

Le spin des atomes peut être entier, fractionnaire, ou nul. En RMN des macromolécules, c'est le spin $\frac{1}{2}$ (ou $-\frac{1}{2}$) qui est majoritairement utilisé, car les atomes possédant un spin nul ne peuvent pas être détectés, tandis que la plupart des autres spins produisent un signal difficile à interpréter. Pour un type d'atome donné, le spin varie d'un isotope à un autre. Chez les macromolécules biologiques, l'hydrogène (^1H) et le phosphore (^{31}P) sont les seuls atomes qui possèdent un spin de $\frac{1}{2}$ et qui sont abondants dans la nature. En effet, le carbone-12 (^{12}C) et l'azote-14 (^{14}N) représentent plus de 99 % des isotopes naturels de carbone et d'azote, mais ne possèdent pas de spin $\frac{1}{2}$ pouvant être exploité en RMN. Afin d'obtenir un signal correspondant aux atomes de carbone et d'azote, la molécule étudiée doit être enrichie isotopiquement en ^{13}C et en ^{15}N , deux isotopes

possédant un spin nucléaire de $-\frac{1}{2}$. De plus, la RMN hétéronucléaire permet d'obtenir des corrélations à travers les liaisons chimiques entre différents types d'atomes, ce qui a révolutionné les études RMN de macromolécules biologiques.

L'expérience RMN la plus simple consiste à exciter simultanément tous les protons (^1H) d'une molécule étudiée. Leur détection en temps réel sous forme de FID (« *Free Induction Decay* ») est ensuite convertie grâce à une transformée de Fourier afin d'obtenir un spectre RMN de fréquences à une dimension (1D). Ces spectres 1D permettent d'obtenir de l'information de base sur des molécules chimiques ou sur de petites macromolécules (peptides, ADN ou ARN). Cependant, l'environnement chimique autour de chacun des protons d'une macromolécule est très similaire, ce qui engendre des chevauchements des signaux et une pauvre résolution des spectres 1D récoltés. Afin de palier ce problème, des expériences de RMN multidimensionnelles sont effectuées. Lors de ces expériences, des séquences d'impulsion complexes sont utilisées afin de transférer le magnétisme à travers l'espace ou à travers une liaison chimique précise. Ces expériences multidimensionnelles sont utilisées afin d'obtenir des données structurales sur des régions définies des macromolécules. Par exemple, lors d'une expérience de RMN bidimensionnelle (2D) de HSQC (« *Heteronuclear Single Quantum Coherence* »), seuls les protons possédants une liaison chimique ^1H - ^{15}N sont observés. Ces expériences complexes permettent donc d'obtenir de l'information structurale plus précise sur la molécule étudiée (Rule 2006).

Lors d'études de molécules d'ARN par RMN, les spectres obtenus peuvent être divisés en plusieurs régions afin de faciliter leur analyse. Chacune de ces régions contient de l'information différente à propos de la molécule d'ARN étudiée. Par exemple, seuls les protons positionnés sur un résidu guanine ou uracile, formant des ponts hydrogènes qui les protègent de l'échange rapide avec le solvant présentent des signaux dans la région imino (9-16 ppm) des spectres RMN (Dieckmann 2008). Cette région est donc très utile pour la

détermination et l'identification de paires de bases, comme celle possiblement formée entre le G39 et le C65 du riborégulateur à adénine.

1.3.2. RMN du mutant U65C du riborégulateur à adénine

Afin d'explorer la structure tridimensionnelle du mutant U65C du riborégulateur à adénine, et plus particulièrement le rôle des résidus G39 et C65, une étude comparative de RMN a été entreprise au laboratoire du Dr. Legault (Delfosse, Bouchard et al. 2010). Lors de cette étude, la région imino du mutant U65C a été comparée à celle du riborégulateur à adénine sauvage de *B. subtilis* (Figure 4). La région imino du spectre HSQC 2D ^1H - ^{15}N du mutant U65C comporte un signal de plus que celle du riborégulateur sauvage lié à l'adénine. Ce signal correspond à une guanine précise, stabilisée par la formation de ponts hydrogènes, présente chez le mutant U65C, mais absente du riborégulateur sauvage. L'analyse de quelques données de RMN suggère qu'il s'agirait du résidu G39. Il n'existe toutefois aucune preuve irréfutable permettant d'attribuer ce signal à un résidu précis du riborégulateur mutant U65C.

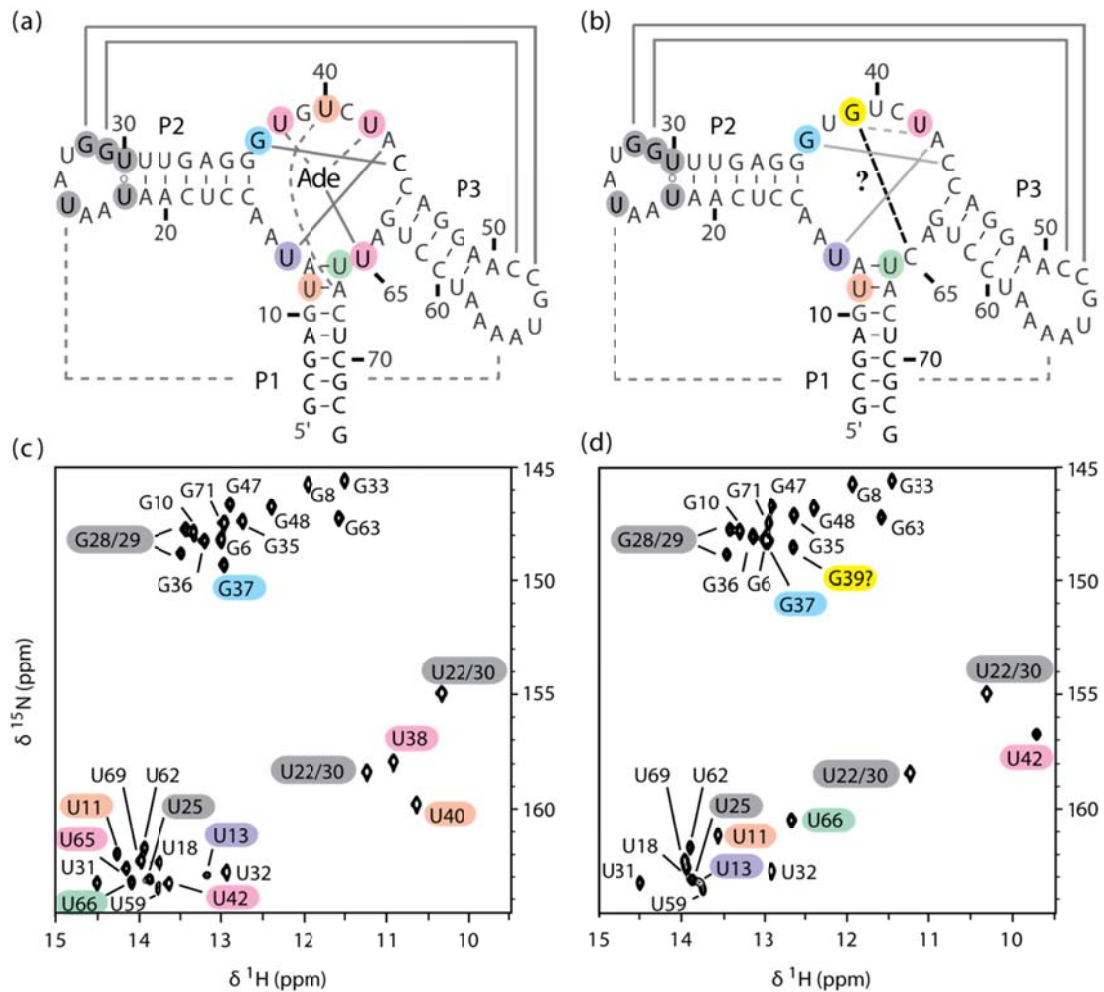


Figure 4 : Structures secondaires et spectres RMN des riborégulateurs à adénine sauvage et mutant U65C.

Les structures secondaires du riborégulateur à adénine (a) sauvage de *B. subtilis* lié à l'adénine et (b) son mutant U65C sans ligand sont représentées en plus de leurs interactions tertiaires connues et suggérées. La région imino de leur spectre 2D HSQC ^1H - ^{15}N correspondant est représentée en dessous (c et d). Tous les signaux sont attribués à leur résidu respectif, sauf un nouveau signal G-imino du mutant U65C (jaune). Ce signal, impossible à attribuer de manière irréfutable, pourrait correspondre à une paire de base impliquant le résidu G39. Adapté de (Delfosse, Bouchard et al. 2010).

1.3.3. Les limites de la RMN des ARN

La RMN est une technique utilisée très fréquemment afin d'obtenir la structure de macromolécules en solution. Toutefois, plusieurs facteurs limitent la taille des ARN pouvant être étudiés, tels que le grand recouvrement des signaux causé par la présence de seulement quatre nucléotides, la faible densité de protons généralement retrouvés chez les molécules d'ARN, ainsi que les problèmes associés à la relaxation des protons (élargissement des lignes, perte de signaux, etc.). Les études d'ARN plus grands que 15 kDa (~50 nt) deviennent alors très complexes et permettent rarement l'obtention de structures tridimensionnelles à haute résolution en utilisant les méthodes de RMN conventionnelles.

C'est pourquoi les gros ARN complexes sont généralement divisés en sous-domaines actifs et stables, afin d'être étudiés par RMN. Cette approche, appelée diviser pour régner (« *Divide and Conquer* »), est fréquemment utilisée pour étudier de longs ARN, comportant plus de 50 nucléotides (Figure 5). Cette technique présente toutefois un inconvénient important : il est difficile de prédire si les sous-unités stables agissent de façon identique lorsqu'elles sont isolées ou dans le contexte de la molécule entière. Même si les sous-unités sont actives, l'absence de certaines interactions tertiaires peut tout de même altérer la structure tridimensionnelle de la molécule (Scott 2007). De plus, certaines molécules présentent une structure très compacte, impossible à diviser en sous-unités stables, comme c'est le cas chez l'aptamère du riborégulateur à adénine mutant U65C (Figure 4b). Cet ARN de 69 nucléotides est donc difficile à étudier par RMN et présente un chevauchement important des signaux dans certaines régions des spectres.

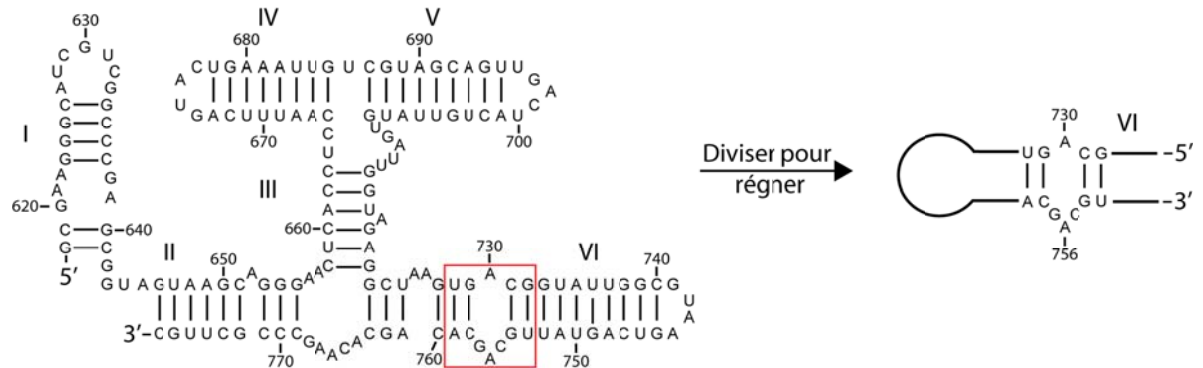


Figure 5 : Approche diviser pour régner.

Le résidu A756, situé dans le renflement de la tige-boucle VI du ribozyme VS (*Varkud Satellite*) de *Neurospora* représente un résidu clé dans le mécanisme de réaction de cet enzyme. L'utilisation de l'approche diviser pour régner permet alors d'entreprendre des études de RMN, en isolant ce sous-domaine stable. Adapté de (Rastogi, Beattie et al. 1996; Desjardins, Bonneau et al. 2011).

1.3.4. Le marquage isotopique spécifique des ARN

Une solution émergente au problème de recouvrement des signaux en RMN des ARN vient palier cet inconvénient de la technique de diviser pour régner. En effet, le marquage isotopique spécifique d'un nucléotide d'intérêt ou d'un segment de nucléotides à l'intérieur d'une molécule entière permet maintenant de diminuer le recouvrement des signaux, tout en gardant les interactions tertiaires intactes (Figure 6). Par le fait même, les molécules d'ARN n'ont plus à être divisées en sous-unités stables afin d'être étudiées. Lorsque le marquage isotopique spécifique est utilisé, la région de l'ARN qui est marquée en ^{13}C et ^{15}N émet des signaux en RMN hétéronucléaire, tandis que la région non-marquée ne produit aucun signal (Ohtsuki, Kawai et al. 1996; Ohtsuki, Kawai et al. 1998). Ceci

permet de diminuer le recouvrement des signaux en analysant une région précise de la molécule, tout en l'étudiant dans le contexte de la molécule entière.

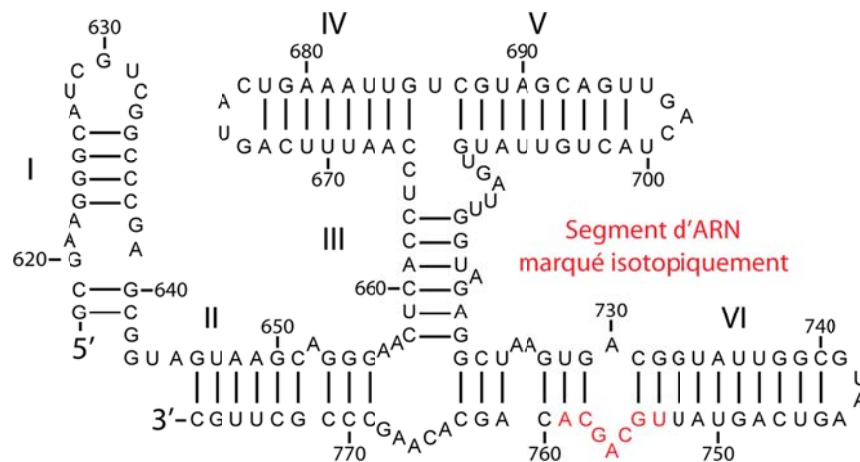


Figure 6 : Marquage segmentaire des ARN.

Seule la tige-boucle VI du ribozyme VS de *Neurospora* est marquée isotopiquement en ^{13}C et ^{15}N , tandis que le reste de la molécule n'est pas marqué. La tige-boucle VI peut alors être étudiée en RMN hétéronucléaire, dans le contexte de la molécule entière. Adapté de (Rastogi, Beattie et al. 1996; Desjardins, Bonneau et al. 2011).

Quelques exemples de marquage isotopique sélectif d'ARN existent déjà dans la littérature (Kinoshita, Nishigaki et al. 1997; Lukavsky, Kim et al. 2003; Hobartner, Rieder et al. 2005; Nelissen, van Gammeren et al. 2008; Kawahara, Haruta et al. 2012). Dans tous les cas, les méthodes développées se basent sur un principe commun : l'ARN d'intérêt est synthétisé en différents fragments, qui sont ensuite ligués par des méthodes enzymatiques ou chimiques. De façon générale, toute technique de marquage isotopique spécifique nécessite l'obtention d'au moins deux fragments d'ARN purifiés, (un fragment contenant des nucléotides marqués isotopiquement et l'autre non) qui possèdent des extrémités 5' et 3'

compatibles avec une méthode de ligation. Ces fragments doivent ensuite être ligués ensemble en effectuant une étape de ligation simple et efficace. Une dernière étape de purification permettant l'obtention du produit final à un niveau de pureté supérieur à 95 % doit finalement être effectuée afin de pouvoir utiliser ce produit pour des études structurales (Lu, Miyazaki et al. 2010). Dans le but de faciliter ces manipulations, certains groupes ont développé des protocoles un peu plus complexes. Par exemple, l'incorporation d'un ribozyme Hammerhead lors de la transcription (Kim, Lukavsky et al. 2002) ou d'un traitement à la RNase H (Duss, Maris et al. 2010) peuvent être utilisés afin d'obtenir les extrémités compatibles avec une ligation enzymatique.

Bien qu'il existe plusieurs exemples de marquages isotopiques sélectifs ayant permis d'obtenir de l'information sur la structure tridimensionnelle de différentes molécules d'ARN, toutes les techniques développées présentent certaines faiblesses. En effet, toutes ces techniques sont laborieuses et nécessitent plusieurs semaines de manipulation en laboratoire afin d'obtenir un seul échantillon de RMN marqué isotopiquement. De plus, la plupart des techniques existantes présentent de très faibles rendements, souvent associés à l'étape de ligation, et surtout aux multiples étapes de purification nécessaires à l'obtention d'un produit final présentant un degré de pureté élevé. Finalement, ces techniques sont très rarement utilisées en laboratoire, principalement dû aux coûts très élevés qui leur sont associées. Ce coût est généralement causé par la grande quantité d'enzymes, de nucléotides marqués isotopiquement et de main-d'œuvre nécessaires à l'obtention d'un échantillon de RMN contenant une molécule marquée sélectivement.

Les études en spectroscopie RMN des ARN pourraient donc bénéficier de nouvelles stratégies de marquage isotopique, qui amélioreraient les faiblesses des méthodes déjà existantes. Afin de développer de telles méthodes, il est important de connaître les outils

disponibles pour chacune des étapes du marquage isotopique sélectif, soit la préparation et la séparation de grande quantités (μ moles) de nucléotides marqués isotopiquement, la synthèse des fragments d'ARN, leur purification et leur ligation.

1.4. La production de nucléotides marqués isotopiquement

La synthèse des ARN utilisés pour le marquage isotopique requiert l'utilisation de nucléotides marqués isotopiquement. Ces nucléotides sont disponibles commercialement, mais ils sont très dispendieux. Puisque les études structurales nécessitent des milligrammes d'ARN marqués isotopiquement, les groupes de recherche préfèrent généralement produire leurs propres nucléotides marqués en laboratoire. Deux protocoles similaires ont été développés afin de produire des centaines de μ moles de nucléotides marqués uniformément en ^{13}C et en ^{15}N , à partir de bactéries *E. coli* cultivées en milieu minimal contenant généralement du méthanol- ^{13}C ou du glucose- ^{13}C , comme seule source de carbone, ainsi qu'un sel d'ammonium- ^{15}N , comme seule source d'azote. (Batey, Inada et al. 1992; Nikonowicz, Sirr et al. 1992) La stratégie employée est assez simple : dans un premier temps, les bactéries sont cultivées, récoltées, puis lysées. Ensuite, dépendamment du protocole utilisé, l'ARNr ou la totalité des acides nucléiques sont isolés par extractions au phénol/chloroforme. Dans le cas de l'extraction totale des acides nucléiques, une étape supplémentaire de purification à l'aide d'une colonne d'affinité de boronate doit être effectuée afin de séparer les ribonucléotides des désoxyribonucléotides. Cette colonne interagit avec les ribonucléotides via leur groupement 2'3'-cis-diols et permet ainsi leur séparation des désoxyribonucléotides, qui ne possèdent pas ce groupement (Schott, Rudloff et al. 1973). L'ARN recueilli doit ensuite être hydrolysé en NMP grâce à une digestion à la nucléase P1. Les NMP recueillis sont finalement phosphorylés en NTP en utilisant un cocktail enzymatique comprenant la myokinase, la pyruvate kinase, la guanylate kinase et la NMP kinase, en présence d'une quantité catalytique d'ATP. Les NTP marqués en ^{13}C et

en ^{15}N ainsi produits peuvent ensuite être repurifiés, si nécessaire, afin d'être compatibles avec la synthèse enzymatique d'ARN (Haynie and Whitesides 1990).

1.4.1. La séparation de nucléosides marqués isotopiquement

Les protocoles de production de nucléotides marqués uniformément en ^{13}C et en ^{15}N déjà existants permettent la production d'un mélange de NTP, qui contient à la fois de l'ATP, du GTP, du CTP et de l'UTP en proportions similaires. Ces mélanges sont très utiles afin de produire des échantillons d'ARN marqués uniformément. Cependant, lorsque l'attribution de certains nucléotides précis nécessite de l'information additionnelle, il est possible d'introduire un ou plusieurs types de nucléotides marqués à l'intérieur de la molécule. Par exemple, l'ajout d'ATP marqué en ^{13}C et en ^{15}N à une réaction de transcription comportant les trois autres types de nucléotides non-marqués permet d'obtenir une molécule présentant des adénines comme seuls nucléotides actifs en RMN hétéronucléaire. Ce type de marquage spécifique, jumelé au marquage segmentaire, peut alors permettre l'introduction d'un seul ou de quelques nucléotides actifs en RMN hétéronucléaire, à l'intérieur d'une molécule autrement inactive. Cependant, ces approches de marquage spécifique des ARN nécessitent la séparation de chacun des nucléotides du mélange obtenu lors de la production de NTP marqués. Cette séparation est effectuée suite à l'étape d'hydrolyse de l'ARN à la nucléase P1, sur un mélange de NMP, puisqu'ils sont plus stables chimiquement que les NTP qui risqueraient de perdre un ou plusieurs groupements phosphates lors de la séparation.

Afin d'être utilisée pour des études structurales, toute technique de séparation des NMP marqués isotopiquement doit être effectuée sur une échelle préparative (centaines de μmoles). De plus, la séparation doit être rapide, facile à effectuer en laboratoire et doit

permettre l'obtention de matériel pur, compatible avec la synthèse enzymatique (Michnicka, Harper et al. 1993; Batey, Battiste et al. 1995; Dieckmann, Suzuki et al. 1996). Les tampons utilisés pour la séparation doivent donc être volatiles ou facilement retirés des NMP purifiés. Malheureusement, il n'existe jusqu'à maintenant, qu'un seul protocole détaillé permettant la séparation préparative des NMP. Cette séparation est effectuée par HPLC à l'aide d'une colonne échangeuse d'anions et nécessite une étape subséquente de purification par colonne d'affinité de boronate afin d'éliminer les sels et être compatible avec la synthèse enzymatique d'ARN (Batey, Battiste et al. 1995). Cette deuxième étape requiert plusieurs jours de manipulation en laboratoire pour chacun des NMP séparés, ce qui augmente considérablement le temps consacré à la préparation des nucléotides.

Avec l'émergence du marquage isotopique spécifique des ARN, il serait avantageux de développer une technique alternative de séparation préparative des NMP marqués, afin de diminuer le temps et les coûts requis pour leur production. Cette technique pourrait être développée en se basant sur diverses méthodes chromatographiques existantes, car plusieurs protocoles déjà établis permettent la séparation d'un mélange de NMP à l'échelle analytique (dizaines de nmol). En effet, la séparation peut être effectuée à l'aide d'une colonne échangeuse d'anions (Cohn 1950), d'une colonne de chromatographie en phase inverse (Krstulovic, Brown et al. 1977) ou par chromatographie en pairage d'ions (Hoffman and Liao 1977; Walseth, Graff et al. 1980). Parmi ces protocoles, la technique la plus prometteuse à être adaptée pour des quantités préparatives de NMP utilise la chromatographie liquide à haute performance en phase inverse avec pairage d'ions (IP-HPLC; « *Ion-Pair reverse phase HPLC* »). Ce type de chromatographie permet de séparer les quatre NMP standards avec une résolution très élevée (Figure 7A), sur une échelle analytique.

1.4.1.1. La chromatographie en phase inverse avec pairage d'ions

Bien que la chromatographie en phase inverse avec pairage d'ions soit une technique très répandue, son mécanisme d'action est toujours incompris et suscite un débat depuis plus de 30 ans. Au cours des années, plusieurs modèles théoriques ont été établis afin d'expliquer les principes gouvernant la rétention et la séparation des analytes sous ces conditions. Malgré ces efforts, les modèles empiriques existants permettent une prédiction plus adéquate que ces modèles théoriques (Cecchi 2008). Ceci démontre bien le manque de documentation sur le rôle de certains processus cruciaux de la chromatographie en pairage d'ions.

On sait toutefois que ce type de chromatographie emploie des ions hydrophobes, nommés agents de pairage ionique (IPR), afin d'effectuer la séparation de molécules ioniques sur une colonne de chromatographie en phase inverse. Ce serait les IPR qui interagissent à la fois avec la colonne, grâce à leurs groupements hydrophobes et avec les analytes à séparer, en formant une interaction ionique. De plus, le pH de l'éluant modifie la charge adoptée par les analytes et constitue donc une caractéristique clé, permettant de dicter la rétention et la sélectivité de la méthode (Fritz 2005). En se basant sur les travaux de chimie analytique du laboratoire Goldberg [Figure 7A; (Walseth, Graff et al. 1980)], ainsi que sur la différence des charges nettes adoptées par chacun des quatre NMP en condition acide (Figure 7B), une technique de séparation préparative des NMP par IP-HPLC pourrait être développée. En choisissant des tampons appropriés, cette technique pourrait permettre l'obtention rapide de grandes quantités de nucléotides compatibles avec le marquage sélectif des ARN.

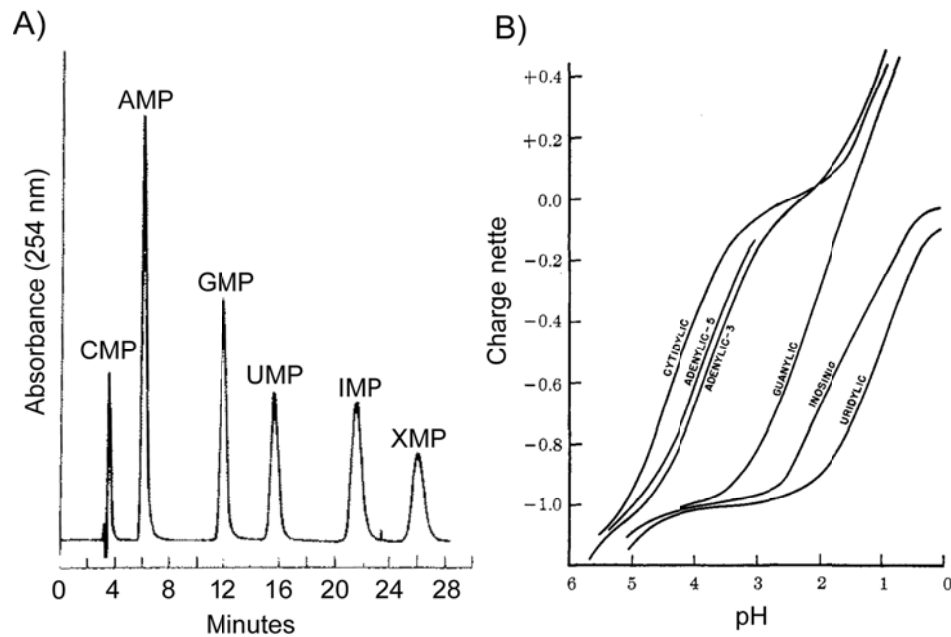


Figure 7 : Séparation analytique de NMP par IP-HPLC.

A) Chromatogramme de séparation d'un mélange de différents NMP en utilisant une colonne analytique en phase inverse par IP-HPLC. La séparation est atteinte à pH 2,5 grâce à l'utilisation de sels de tétrabutylammonium comme agent de pairage ionique, et de méthanol comme éluant (Walseth, Graff et al. 1980). **B)** Charge nette de différents acides nucléiques en fonction du pH. Entre les pH 2,5 et 3,5, les charges nettes des différents NMP sont très différentes, ce qui pourrait permettre leur séparation (Cohn 1950).

1.5. La synthèse d'ARN

L'ARN utilisé en spectroscopie RMN ne peut être isolé de sources naturelles pour deux raisons simples. Premièrement, la quantité requise pour déterminer une structure tridimensionnelle par spectroscopie RMN est généralement trop élevée (entre 1-2 mM d'ARN dans un volume de 350 ou 500 μ L). De plus, les études de RMN hétéronucléaires nécessitent l'enrichissement en isotopes actifs (^{13}C et ^{15}N), présents en proportion trop faible dans la nature. Les ARN étudiés doivent donc être synthétisés *in vitro*. La synthèse peut être effectuée chimiquement ou enzymatiquement.

1.5.1. La synthèse chimique d'ARN

La majorité des protocoles de ligation existants utilisent des fragments d'ARN synthétisés chimiquement, puisque la synthèse chimique permet l'incorporation facile de certains nucléotides modifiés (marqueurs fluorescents, nucléotides photo-activables, etc.) à l'intérieur d'une molécule d'ARN. La synthèse chimique est effectuée sur un support solide et consiste en l'addition de nucléosides sous forme de précurseurs phosphoramidites (Figure 8). Afin d'obtenir un oligonucléotide d'ARN présentant une séquence définie, l'ARN doit être synthétisé en plusieurs cycles, où chaque cycle permet l'ajout successif de nucléosides, de l'extrémité 3' vers l'extrémité 5' de l'ARN. Ce type de synthèse est généralement effectué à l'aide d'un synthétiseur automatique et permet l'obtention de courtes séquences d'ARN avec un taux de fidélité très élevé. Il est cependant déconseillé d'utiliser la synthèse chimique pour obtenir des ARN plus longs que 50-100 nucléotides, dû aux faibles rendements obtenus pour de telles séquences (Caruthers 2011).

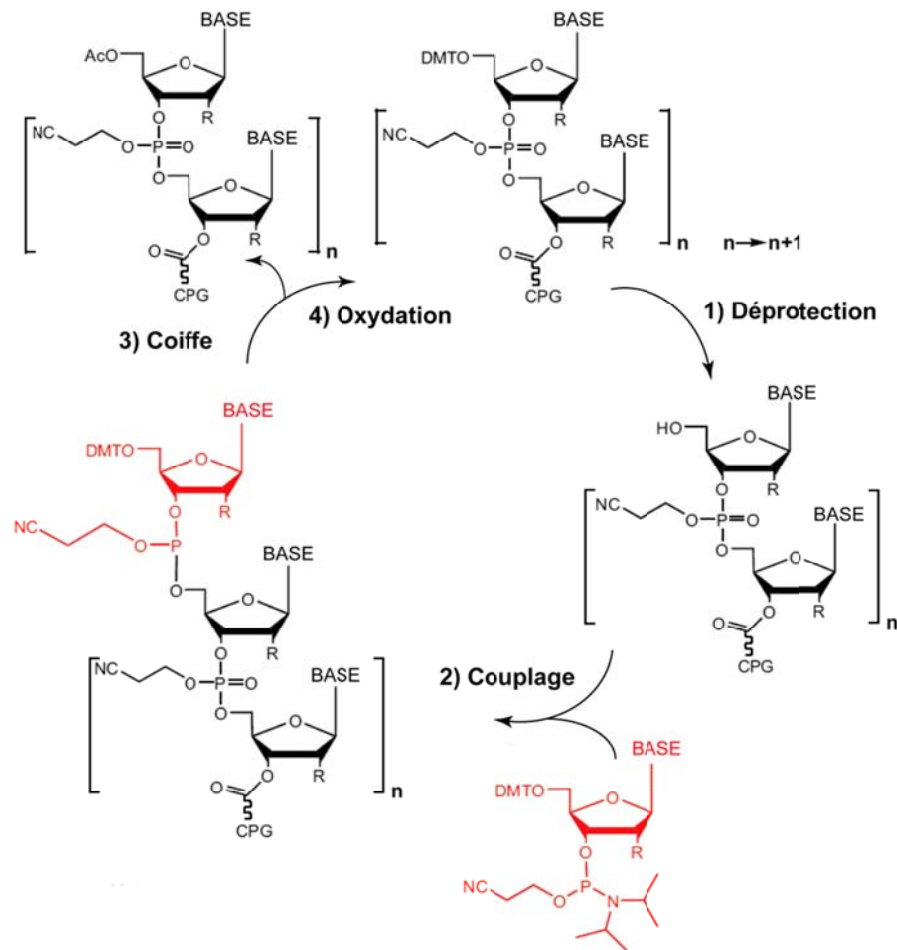


Figure 8 : Synthèse chimique d'ARN.

Un cycle d'une synthèse chimique d'ARN effectué à l'aide d'un synthétiseur. Le cycle comprend quatre étapes : 1) la déprotection du groupement hydroxyle en 5' de l'oligonucléotide, 2) le couplage d'un nucléoside phosphoramidite à la chaîne déjà synthétisée, 3) l'ajout d'une coiffe en 5' des nucléotides qui n'ont pas réagit (1-2 %) afin d'éviter la formation d'oligonucléotides avec des nucléotides manquants, et 4) une étape d'oxydation permet d'obtenir une liaison phosphate diester stable, ce qui termine le cycle de synthèse chimique. Adapté de (Meylan 2007).

1.5.2. La synthèse enzymatique d'ARN

De façon générale, les ARN étudiés par les méthodes conventionnelles de spectroscopie RMN sont synthétisés à l'aide de la polymérase à ARN du phage T7. Ces réactions de transcription *in vitro* sont effectuées en présence d'un gabarit d'ADN contenant la séquence d'intérêt et de NTP (nucléotides triphosphates) marqués uniformément en isotopes ^{13}C et ^{15}N . Ces composés sont tous disponibles commercialement et peuvent alternativement être produits en laboratoire à partir de protocoles déjà établis, afin de rendre la réaction moins dispendieuse (Batey, Inada et al. 1992; Nikonowicz, Sirt et al. 1992; Li, Wang et al. 1999).

Les gabarits d'ADN peuvent être formés de plusieurs façons, soit par appariement de deux oligonucléotides simples brins contenant la séquence de 17 nucléotides du promoteur T7, suivie de la séquence gabarit pour la transcription de l'ARN d'intérêt, soit par insertion de la séquence d'intérêt en aval du promoteur T7 dans un plasmide d'ADN double brin ou par PCR (Milligan and Uhlenbeck 1989). L'utilisation d'un plasmide comme gabarit est généralement favorisée pour la production de grandes quantités d'ARN de plus grande taille (> 50 nucléotides), car ces plasmides permettent d'obtenir de meilleurs rendements.

Comme toute enzyme, la polymérase à ARN du phage T7 possède quelques contraintes vis-à-vis son substrat. En effet, la séquence de l'ARN transcrit doit généralement commencer par une guanine pour qu'il y ait transcription enzymatique. Dans les cas où l'identité de la séquence en 5' est flexible, l'utilisation d'une séquence commençant par GGA est suggérée afin d'obtenir des rendements de transcription

optimaux (Gruegelsiepe, Schön et al. 2005). De plus, certaines stratégies élégantes ont été développées afin de transcrire des ARN possédants une extrémité 5' compatible pour des manipulations subséquentes. Par exemple, la transcription peut être initiée à l'aide d'un excès de guanosine afin de générer une extrémité 5'-OH, utile pour des études RMN ou de marquage radioactif au ^{32}P . Elle peut aussi être initiée en utilisant un excès de GMP (guanosine-5'-monophosphate) afin de générer une extrémité 5'-monophosphate (Pitulle, Kleineidam et al. 1992), compatible avec des méthodes de ligation. Dans les deux cas, la guanosine ou le GMP sont introduits de façon commode, qu'au tout premier résidu en 5' de l'ARN d'intérêt (Sampson and Uhlenbeck 1988).

La synthèse enzymatique peut par contre engendrer des problèmes d'hétérogénéité à l'extrémité 3' de l'ARN d'intérêt en ajoutant quelques nucléotides qui ne sont pas présents sur le gabarit d'ADN (Milligan, Groebe et al. 1987). Cet effet est aussi aperçu à l'extrémité 5' de l'ARN lorsque la séquence à transcrire possède plus de 3 résidus G de suite (Gruegelsiepe, Schön et al. 2005). Pour les études structurales ou d'autres études nécessitant la ligation des ARN, il est très important d'obtenir des échantillons d'ARN complètement homogènes. Pour atteindre cet objectif, plusieurs groupes utilisent des gabarits d'ADN contenant des groupements 2'-O-méthylés (Kao, Zheng et al. 1999) ou ajoutent simplement des séquences codant pour des ribozymes (ARN catalytiques) auto-clivables aux deux extrémités de la séquence codant pour l'ARN d'intérêt. Par exemple, en flanquant la séquence d'intérêt par un ribozyme Hammerhead en 5', ainsi qu'un ribozyme HDV (*Hepatitis Delta Virus*) en 3', on obtient un ARN 100 % homogène aux deux extrémités, suite à l'activité d'auto-clivage des ribozymes déclenchée après la transcription [Figure 9; (Mörl, Lizano et al. 2005)]. Cette méthode peut aussi être employée avec n'importe quel autre ribozyme auto-clivable, tels que les ribozymes Hairpin, VS ou le *glmS*. L'ajout d'un ribozyme auto-clivable à l'extrémité 5' de l'ARN permet aussi une certaine flexibilité de séquence, car les ARN synthétisés enzymatiquement à l'aide de la polymérase T7 doivent généralement commencer par un G. La présence d'un ribozyme auto-clivable

permet alors de synthétiser des ARN d'intérêts débutants par n'importe quel nucléotide, en autant que la structure adoptée par la molécule permette le clivage. Dans le même ordre d'idées, il existe aussi un promoteur moins bien caractérisé qui permet l'initiation de la transcription à l'aide d'une adénine, ce qui offre une plus grande flexibilité de séquences, sans avoir à utiliser de ribozymes (Huang, Wang et al. 2003; Coleman, Wang et al. 2004).

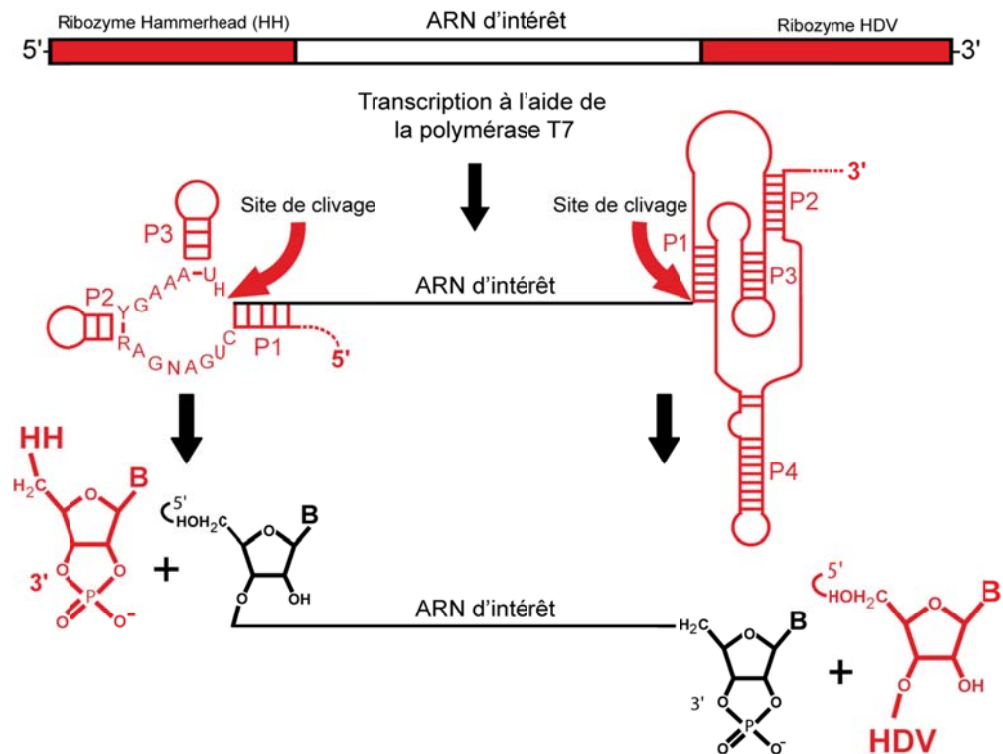


Figure 9 : Stratégie permettant l'obtention d'extrémités 100 % homogènes par transcription enzymatique.

Une stratégie pour la transcription enzymatique d'ARN possédant des extrémités 100 % homogènes est présentée. La séquence codant pour l'ARN d'intérêt est flanquée de deux ribozymes auto-clivables. Suite à la transcription, les ribozymes se replient afin d'adopter leur structure tridimensionnelle active, ce qui cause leur auto-clivage aux sites

immédiatement en amont et en aval de l'ARN d'intérêt. L'ARN produit est alors homogène à 100 %. Cet ARN possède une extrémité 5'-OH et une extrémité 2'-3'-phosphate cyclique, causées suite au clivage des ribozymes Hammerhead et HDV. Adapté de (Mörl, Lizano et al. 2005).

1.6. La purification des ARN

Une fois synthétisé, l'ARN doit être purifié des sous-produits de synthèse avant d'être utilisé. Pour ce faire, plusieurs techniques ont été développées. La purification peut être effectuée par électrophorèse sur gels dénaturants ou par différentes techniques chromatographiques.

1.6.1. La purification par électrophorèse sur gels dénaturants

La méthode la plus fréquemment utilisée afin de purifier l'ARN synthétisé pour des études structurales est l'électrophorèse sur gels dénaturants. Cette méthode permet l'obtention de quantités préparatives d'ARN (plusieurs milligrammes), pouvant atteindre un niveau de pureté au nucléotide près, chez les ARN de petite taille [< 50 nucléotides; (Wyatt, Chastain et al. 1991)]. Elle consiste à faire migrer l'ARN sur des gels de polyacrylamide contenant 7 ou 8 M d'urée, un agent dénaturant. La migration s'effectue durant plusieurs heures, avec un voltage constant afin que l'ARN d'intérêt migre sous forme d'une bande bien définie. Lorsque l'ARN atteint le bas du gel, la bande correspondant à l'ARN d'intérêt, séparé des sous-produits de synthèse est découpée. L'ARN est ensuite élué hors de l'acrylamide, soit en broyant le gel et en effectuant des

trempages en tampons salins (technique de « *Crush & Soak* ») ou par une technique d'électroélution.

Bien que la purification par électrophorèse sur gels dénaturants procure de bons rendements (45-75 % de recouvrement de l'ARN) et permette la purification d'ARN à un très haut niveau de pureté, cette méthode nécessite environ une semaine de manipulations en laboratoire et s'effectue dans des conditions dénaturantes, ce qui est particulièrement problématique pour les gros ARN.

1.6.2. La purification par chromatographie liquide

Afin de diminuer le temps requis pour la purification des ARN, plusieurs groupes ont élaboré des protocoles qui tirent profits de la chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC) et à performance rapide (FPLC). Certains protocoles exploitent la présence de groupements phosphates chargés négativement, présents sur l'ARN, en utilisant une matrice échangeuse d'anions ou une matrice non-polaire avec pairage d'ions (IP-HPLC). Lors de ces expériences, un gradient de sel jumelé au chauffage de la colonne ou à l'ajout d'agents dénaturants permet la séparation des ARN selon leur taille (Anderson, Scaringe et al. 1996; Shields, Mollova et al. 1999; Azarani and Hecker 2001; Noll, Seiffert et al. 2011). Ces échantillons, doivent ensuite être dessalés et repliés avant d'être utilisés.

D'autres groupes utilisent des colonnes de tamis moléculaires afin de séparer l'ARN selon sa taille et sa conformation. Cette technique alternative permet l'obtention d'ARN suffisamment purs pour effectuer des études structurales, en gardant sa conformation native intacte (Lukavsky and Puglisi 2004; Kim, McKenna et al. 2007), ce qui n'est pas toujours le cas pour d'autres méthodes de purification. Cet aspect est très important, surtout pour les

ARN de grande taille, car il n'est jamais garanti que l'ARN adopte la même conformation avant et après dénaturation. Suite à ces études, un protocole de séparation non-dénaturant d'ARN utilisant une matrice échangeuse d'anions a aussi été développé (Easton, Shibata et al. 2010).

Bien que beaucoup plus rapide que la purification sur gels dénaturants (certains de ces protocoles permettent la purification d'ARN en une seule journée), ces méthodes de purification par chromatographie liquide nécessitent de grandes quantités de tampon, une étape de concentration de l'ARN purifié, l'optimisation de différents protocoles pour la purification d'ARN de différentes longueurs et ne permettent une purification avec une résolution au nucléotide près, que pour de très petits ARN (< 20 nt).

1.6.3. La purification par affinité

À titre d'alternatives aux méthodes de purification non-dénaturantes classiques, des techniques de purification par affinité ont été développées. Ces techniques permettent l'obtention rapide d'ARN purs, sans avoir à être optimisées pour des ARN de différentes tailles. Ces protocoles sont fréquemment utilisées en laboratoire pour la purification simple et efficace de protéines [étiquettes de polyhistidines ou de Gluathion-S-Transférase (GST)], il est donc logique qu'elles soient maintenant développées afin de purifier l'ARN.

L'une d'entre elles permet la purification d'ARN en 3 jours de manipulations, en utilisant une colonne d'affinité à l'ADN. Pour être purifié, l'ARN d'intérêt doit posséder une séquence de nucléotides complémentaires à son extrémité 3'. Cette séquence permet la liaison au support solide via la formation de paires de bases avec l'ADN greffé sur la colonne. Après plusieurs lavages, l'ARN d'intérêt est relâché grâce au clivage d'une

enzyme à ADN (DNAzyme) qui possède une activité en *trans* (Cheong, Hwang et al. 2004). L'ARN d'intérêt est alors purifié rapidement et demeure sous sa conformation native. Cependant, cette technique procure de faibles rendements et nécessite des manipulations additionnelles, car le DNAzyme introduit afin de cliver l'ARN doit ensuite être enlevé de l'échantillon grâce à une digestion à la DNase I et l'utilisation d'un tamis moléculaire.

Une autre technique de purification par affinité permet la purification de l'ARN en une seule étape, en exploitant une interaction protéine-ARN de haute affinité afin d'immobiliser l'ARN sur des billes de nickel (Ni^{2+}). L'utilisation d'une protéine recombinante MS2, possédant une étiquette de polyhistidines, permet la liaison au support solide et l'immobilisation subséquente de l'ARN via l'interaction entre la protéine MS2 et une tige-boucle incorporée à son extrémité 3'. Suite à plusieurs lavages, l'ARN est clivé grâce à l'incorporation de glucosamine-6-phosphate (GlcN6P), un cofacteur qui permet d'activer l'auto-clivage du ribozyme *glmS*, placé en 3' de l'ARN à purifier [Figure 10; (Kieft and Batey 2004; Batey and Kieft 2007)]. Cette technique peut être utilisée afin de purifier quelques milligrammes (mg) d'ARN, en moins d'une journée de manipulations. Toutefois, ce protocole, tout comme celui utilisant un DNAzyme, n'a pas été développé dans le but d'optimiser la pureté et la quantité des ARN obtenus. Il est donc impossible de prédire si ces techniques permettent l'obtention de divers ARN présentant une quantité et une pureté adéquate pour des études biochimiques et structurales de façon constante.

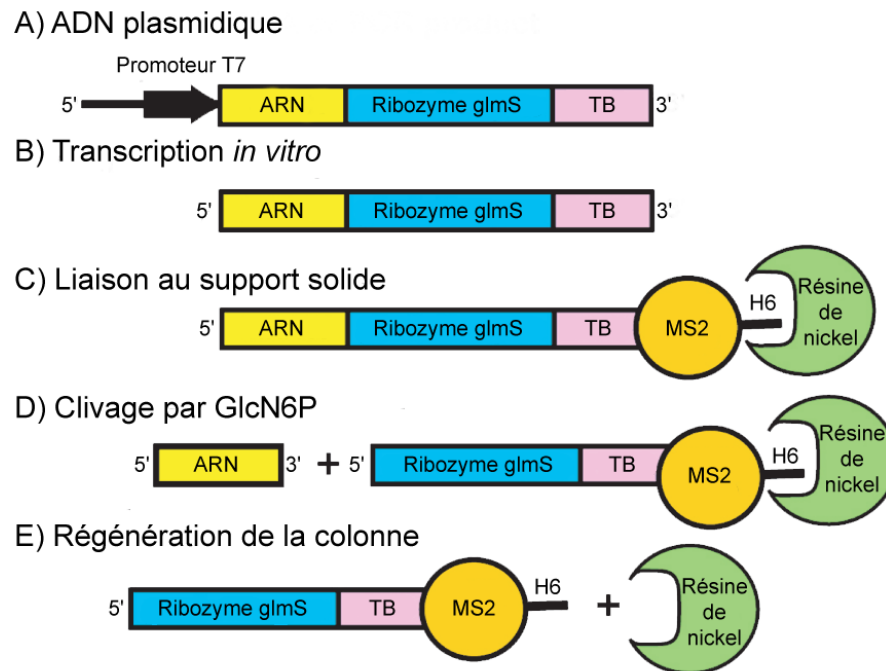


Figure 10 : Purification d'ARN par affinité sur colonne de nickel.

A) ADN plasmidique nécessaire à cette stratégie de purification par affinité des ARN. **B)** ARN produit suite à une transcription enzymatique. Cet ARN présente une étiquette contenant le ribozyme *glmS* et une tige-boucle (TB) liant la protéine MS2. **C)** Liaison de l'ARN au support solide via une interaction entre la tige-boucle et la protéine MS2. **D)** L'ARN d'intérêt est relâché suite à l'introduction de la GlcN6P. **E)** La colonne est ensuite régénérée afin d'être réutilisée. H6 représente l'étiquette de polyhistidines de la protéine recombinante. Adapté de (Batey and Kieft 2007).

S'inspirant des méthodes déjà existantes, notre laboratoire a développé une technique de purification d'ARN par affinité qui permet l'obtention d'ARN repliés dans leurs conformations natives à un degré de pureté semblable aux méthodes de purifications dénaturantes, fréquemment utilisées en laboratoire (Di Tomasso, Lampron et al. 2011). Cette technique tire profit de l'étiquette ARiBo, transcrit à l'extrémité 3' de l'ARN

d'intérêt. Cette étiquette contient un ribozyme activable (le ribozyme *glmS*) permettant l'élution de l'ARN d'intérêt, ainsi que l'ARN *BoxB* du bactériophage lambda (λ), utilisé afin de fixer l'ARN d'intérêt à un support solide. Lors de cette procédure, l'ARN à purifier est premièrement transcrit sous forme d'ARN de fusion contenant l'étiquette ARiBo. Par la suite, l'ARN est fixé sur une résine de glutathion-sépharose (GSH-sépharose) grâce à l'interaction entre le GSH et une protéine de fusion contenant la protéine GST (Di Tomasso, Dagenais et al. 2012). Cette protéine de fusion est composée du peptide-N du bactériophage λ et de la protéine GST. L'ARN se lie à la protéine de fusion via l'interaction entre un peptide-N λ mutant et l'ARN *Boxb*, qui présente une interaction de très haute affinité ($K_d \geq 10$ pM) (Austin, Xia et al. 2002). Finalement, suite à plusieurs lavages permettant d'enlever les impuretés, l'ARN est élué grâce à l'introduction de GlcN6P, qui permet d'activer l'auto-clivage du ribozyme *glmS* (Figure 11).

A) Transcription *in vitro* de l'ARN et de l'étiquette ARiBo



B) Liaison sur support solide



C) Auto-clivage de l'ARN par introduction de GlcN6P



D) Régénération de la colonne

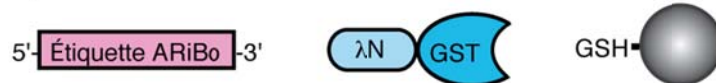


Figure 11 : Stratégie de purification d'ARN par affinité avec l'étiquette ARiBo.

A) L'ARN à purifier est transcrit enzymatiquement en 5' d'une étiquette ARiBo. **B)** L'ARN est lié au support solide GSH-sépharose grâce à son interaction avec une protéine de fusion

λ N-GST. **C)** La glucosamine-6-phosphate est introduite afin de relâcher l'ARN d'intérêt en solution. **D)** La résine peut alors être régénérée afin d'enlever l'étiquette ARiBo et la protéine de fusion, pour permettre la purification subséquente d'ARN. Adapté de (Di Tomasso, Lampron et al. 2011).

La méthode de purification par affinité avec étiquette ARiBo permet la purification de milligrammes d'ARN contenant une extrémité 3' homogène en quelques heures de purification (Di Tomasso, Dagenais et al. 2012). Cette technique a été testée afin de purifier divers ARN, tels que des riborégulateurs, de petites tige-boucles, le ribozyme VS de *Neurospora*, ainsi que plusieurs pre-microARN. Les ARN obtenus peuvent servir pour des études biochimiques, biophysiques et même pour des études structurales, étant donné le haut degré de pureté obtenu, pouvant atteindre un niveau supérieur à 99 % et un rendement allant jusqu'à ~0,60 mg/mL de transcription.

La purification par affinité avec l'étiquette ARiBo est donc une technique de choix pour la purification rapide et efficace d'ARN fonctionnels. Cependant, comme toutes autres techniques de purification par affinité, elle présente quelques inconvénients associés aux outils biochimiques qui la composent. Dans ce cas, la plus grande limitation provient de l'identité du nucléotide situé immédiatement avant le site de clivage du ribozyme *glmS*.

1.6.3.1. Le ribozyme *glmS*

Le ribozyme *glmS* de *Bacillus anthracis*, catalyse une réaction d'auto-clivage d'une liaison phosphodiester entre deux nucléotides précis, situés à son extrémité 5'. Tout comme les autres ribozymes auto-clivables connus (les ribozymes Hairpin, Hammerhead, VS et HDV), la réaction d'auto-clivage du ribozyme *glmS* implique une attaque nucléophile d'un 2'-OH vicinal sur un phosphate afin de former deux fragments d'ARN, l'un ayant une extrémité 2'-3'-phosphate cyclique, et l'autre, une extrémité 5'-hydroxyle. Le ribozyme *glmS* est toutefois différent des autres ribozymes auto-clivables, car son activité doit être activée par la présence de son cofacteur, la glucosamine-6-phosphate (GlcN6P). Cette caractéristique lui permet d'être considéré à la fois comme un ribozyme et un riborégulateur. En effet, le *glmS* régule la concentration de son cofacteur chez les bactéries gram positives, en clivant l'ARNm codant pour la glucosamine-6-phosphate synthétase. Suite au clivage, l'extrémité 5'-triphosphate de l'ARNm devient une extrémité 5'-hydroxyle, et est reconnue par la RNase J1, qui peut la dégrader (Winkler, Nahvi et al. 2004).

Des études précédentes (Barrick, Corbino et al. 2004; Roth, Nahvi et al. 2006) ont démontré qu'une adénine située immédiatement avant le site de clivage (résidu N-1) est conservée durant l'évolution chez les bactéries gram positives et représente la séquence minimale nécessaire au clivage par le *glmS*. Une mutation ponctuelle de cette adénine en guanine provoque une baisse considérable de l'activité de clivage du ribozyme. De plus, la structure cristallographique du *glmS* lié à la GlcN6P (Cochrane, Lipchock et al. 2007) démontre la présence de deux ponts hydrogènes entre le résidu A-1 et le résidu G57 du *glmS* (Figure 12). Comme le G57 interagit directement avec la GlcN6P, il est très probable que le résidu A-1 joue un rôle dans l'organisation du site de clivage du *glmS*.

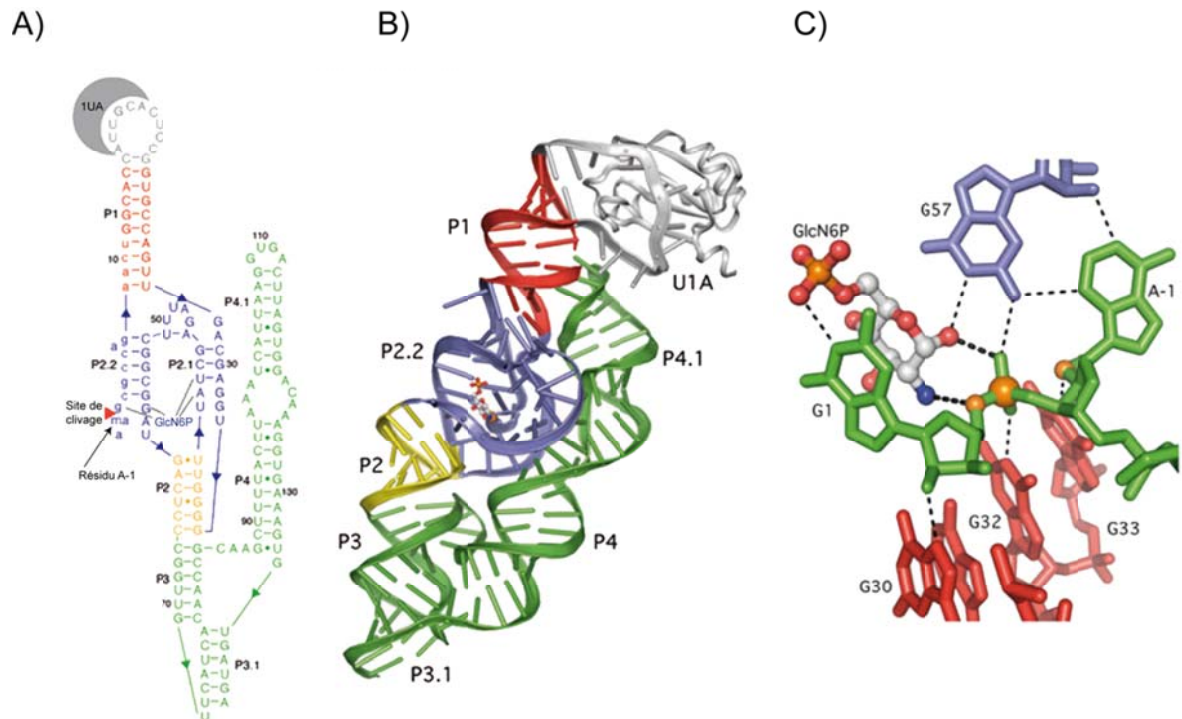


Figure 12 : Ribozyme *glmS* et son site de clivage.

Représentation de la structure secondaire **A)** et tertiaire **B)** du ribozyme *glmS* utilisé pour des études cristallographiques. Le site de clivage est indiqué par une flèche rouge et le résidu A-1 présente un groupement 2'-O-méthyle. Les ponts hydrogènes stabilisant le site de clivage, présents entre le résidu A-1 et le résidu G57 sont représentés en **C)**. Adapté de (Cochrane, Lipchock et al. 2007).

L'importance du résidu A-1 pour l'activité du ribozyme *glmS* restreint l'étendue de séquences pouvant être purifiées par affinité en utilisant la méthode ARiBo ou d'autres méthodes basées sur le *glmS*. En effet, le clivage du *glmS* laisse une adénine à l'extrémité 3' de l'ARN purifié. Ce résidu n'affecte généralement pas la fonction de l'ARN d'intérêt; donc, la plupart des ARN peuvent être purifiés ainsi. L'ajout d'une adénine peut toutefois être très problématique lorsque l'ARN purifié doit se terminer par une séquence précise, comme c'est le cas lors de la préparation d'un ARN utilisé comme fragment précurseur 5' pour une étude nécessitant la ligation d'ARN. Les techniques de purification d'ARN par

affinité qui utilisent le ribozyme *glmS* ne sont donc pas toujours compatibles avec le marquage isotopique spécifique des ARN.

1.7. La ligation des ARN

La ligation des ARN est souvent utilisée afin d'incorporer des nucléotides modifiés (fluorophores, acide désoxyribonucléique, nucléotides photo-activables, etc.) à l'intérieur d'une longue séquence d'ARN. La ligation peut aussi être utilisée afin d'effectuer du marquage spécifique (section 1.3.4), en ligant un premier fragment d'ARN marqué isotopiquement à un deuxième fragment, non-marqué. Pour ce faire, plusieurs techniques ont été développées. La ligation d'ARN peut être effectuée à l'aide de composés chimiques ou par des processus enzymatiques.

1.7.1. La ligation chimique des ARN

Plusieurs composés chimiques peuvent être utilisés afin de lier deux molécules d'ARN. Certains d'entre eux permettent de créer une liaison phosphodiester, comme celle retrouvée chez les ARN natifs, tandis que d'autres composés introduisent un lien non-naturel au site de ligation.

1.7.1.1. Formation d'une liaison phosphodiester

La ligation chimique peut être effectuée grâce à des composés tels que le bromure de cyanogène ou des cyanamides solubles. Ces réactifs chimiques permettent d'activer un

groupement phosphate sur l'un des fragments d'ARN à liguer, qui peut ensuite être attaqué par le groupement hydroxyle de l'autre fragment (Paredes, Evans et al. 2011). Cependant, pour que cette réaction ait lieu, les groupements phosphate et hydroxyle doivent être à proximité l'un de l'autre. Les deux fragments d'ARN à liguer doivent donc être rapprochés en utilisant un ADN d'appariement simple brin, conçu afin de former des paires de bases avec les deux fragments d'ARN, de chaque côté du site de ligation (Figure 13).

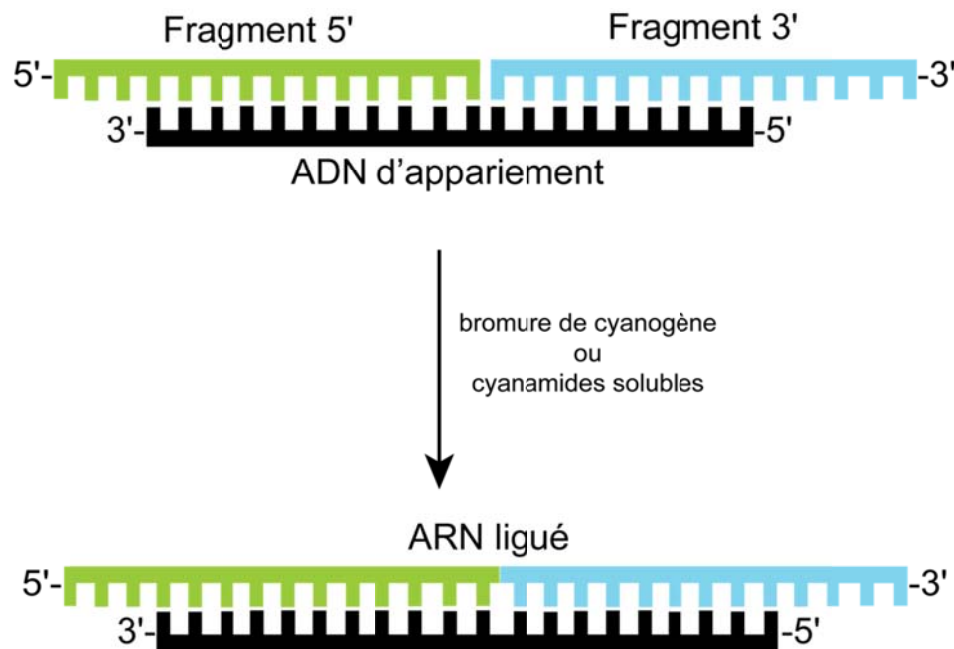


Figure 13 : Ligation chimique d'ARN avec ADN d'appariement.

Schématisme de la réaction permettant la création d'une nouvelle liaison phosphodiester entre deux fragments d'ARN. Les fragments sont rapprochés par l'utilisation d'un ADN d'appariement, puis ligés grâce à l'ajout de bromure de cyanogène ou de cyanamides solubles.

Bien qu'il permette la formation d'une liaison phosphodiester native, ce type de ligation chimique est rarement employé, car il procure des rendements très faibles. Généralement, cette réaction permet la ligation de moins de 20 % des fragments d'ARN initiaux et nécessite jusqu'à 6 jours de réaction (Sokolova, Ashirbekova et al. 1988; Dolinnaya, Sokolova et al. 1991; Mitra and Damha 2007). De plus, le bromure de cyanogène et les cyanamides solubles peuvent réagir avec les bases azotées des ARN, créant des ARN modifiés comme sous-produits.

1.7.1.2. Formation d'une liaison non-naturelle

Trois types de ligation chimique introduisant des liaisons non-naturelles ont été utilisés afin d'effectuer des études sur de petits ribozymes. Ces ARN catalytiques sont très utiles pour démontrer si l'introduction de ces liaisons non-naturelles modifie ou non l'activité de la molécule, car il est facile de comparer l'activité d'une molécule issue d'une ligation à celle d'un ribozyme sauvage. Une ligation incorporant un groupement morpholino (Figure 14a) à l'intérieur du ribozyme Hammerhead a été effectuée, avec des rendements de plus de 95 %, en 7 jours de réaction. Des liaisons disulfides peuvent aussi être employées pour liguer deux fragments d'ARN ensemble (Figure 14b), comme le démontre la production d'un ribozyme VS ayant des groupements thiols (Jaikaran, Smith et al. 2008). Finalement, la chimie-clique (« *click-chemistry* »), est une technique émergente permettant la liaison de fragments d'ARN via l'introduction d'un groupement triazole dans sa chaîne principale (Figure 14c,d). Cette technique permet une ligation à près de 100 % de rendement, en seulement 2 heures de réaction. Elle peut être effectuée avec ou sans gabarit d'ADN, elle est compatible avec la synthèse enzymatique des ARN et elle ne forme pas de sous-produit de réaction (Paredes and Das 2011). La chimie-clique a récemment été utilisée afin de liguer des ribozymes Hammerhead et Hairpin avec de tels rendements (El-Sagheer and Brown 2010).

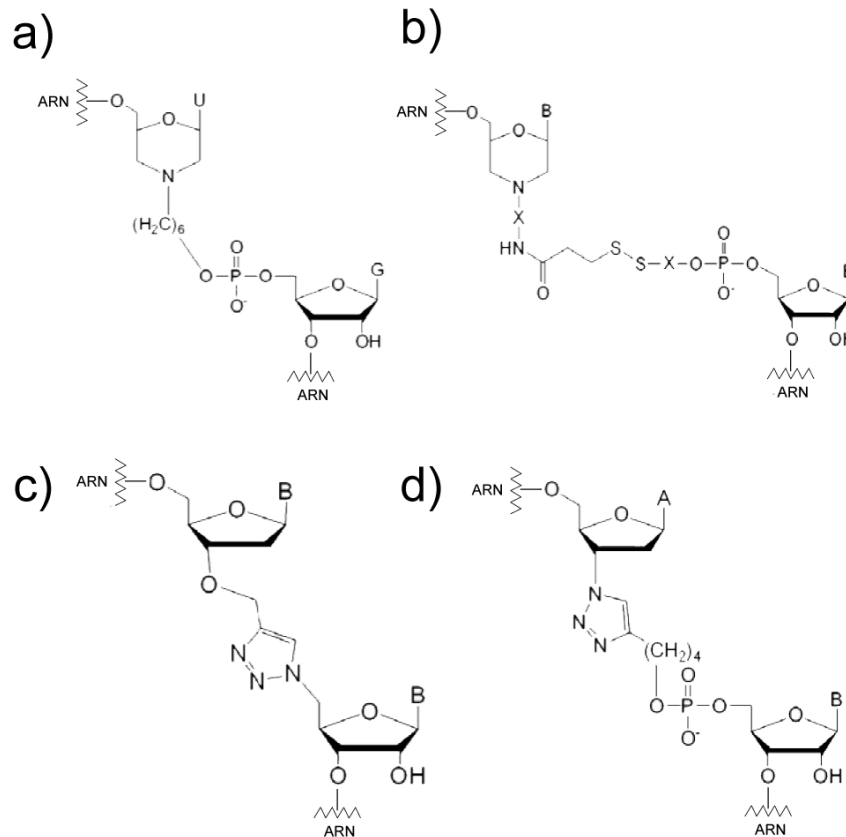


Figure 14 : Liaisons covalentes non-naturelles introduites par ligations chimiques.

Plusieurs stratégies de ligation chimique introduisent des liaisons non-naturelles à l'intérieur de la chaîne principale des ARN ligués. Parmi ces liaisons, les groupements morpholino (**a**), thiol (**b**) et triazole (**c** et **d**) sont les plus utilisés. Adapté de (Paredes, Evans et al. 2011).

Ces trois types de ligation chimique ont permis d'obtenir des ribozymes actifs, dont l'activité n'était pas diminuée par rapport aux ribozymes naturels servant de contrôles. Cependant, dans tous ces exemples, les groupements non-naturels ont été introduits à des sites distants du site actif des ribozymes. De plus, une étude de RMN et de dichroïsme circulaire récente (Mutisya, Selvam et al. 2011) démontre que l'introduction d'un

groupement triazole dans la chaîne principale d'un ARN pourrait empêcher la formation d'une conformation en double-hélice. Ce groupement, introduit par chimie-clique, n'agit donc pas exactement comme les phosphates natifs de l'ARN. Donc, même si ces réactions chimiques permettent l'obtention d'ARN ligués avec de très bons rendements, il est important de choisir un site de ligation qui n'affecte pas l'activité de la molécule ou la propriété étudiée.

1.7.2. La ligation enzymatique des ARN

Plusieurs enzymes spécifiques permettent également de liguer des fragments d'ARN. La plupart des ligases utilisées en laboratoire proviennent du bactériophage T4, un virus à bactéries qui infecte ses cellules hôtes en y injectant son propre matériel génétique. Le virus peut alors exploiter la machinerie de biosynthèse de la bactérie afin de se répliquer. À cette fin, le bactériophage T4 produit trois ligases différentes : une ligase à ADN, ainsi que deux ligases à ARN. Ces enzymes sont utilisées afin de réparer des brisures simples brins et/ou doubles brins à l'intérieur d'une chaîne de polynucléotides (Heaphy, Singh et al. 1987; Lindahl and Barnes 1992). En plus des enzymes naturels, certains DNAszymes ont été développés afin de liguer les acides nucléiques *in vitro*. Toutes ces enzymes possèdent diverses propriétés qui leur sont propres, présentant certains avantages et certains inconvénients pour la ligation d'ARN *in vitro*. Différentes stratégies de ligation, employant divers enzymes, doivent donc être choisies en fonction de la séquence des fragments à liguer.

Le terme ARN accepteur est généralement utilisé afin de nommer le fragment d'ARN à liguer qui contient un groupement 3'-terminal réactif et constitue l'extrémité 5' du

produit final de ligation, tandis que le terme ARN donneur désigne le fragment contenant le groupement 5'-terminal réactif et constitue l'extrémité 3' du produit final de ligation.

1.7.2.1. Utilisation de la ligase à ADN du phage T4

Bien que la ligase à ADN du phage T4 soit normalement utilisée en laboratoire afin de liguer des fragments d'ADN, elle permet aussi de catalyser la formation d'une liaison phosphodiester entre deux molécules d'ARN, d'où son nom original : « *polynucleotide ligase* » (Kleppe, Van de Sande et al. 1970). Cette enzyme ATP-dépendante reconnaît une brisure située sur un seul brin d'un substrat autrement doubles brins. Afin de l'utiliser pour liguer deux fragments d'ARN, un ADN ou un ARN d'appariement doit être utilisé (Figure 15A). Bien qu'il soit possible d'utiliser une molécule d'ARN pour l'appariement, les ADN d'appariements sont généralement favorisés, car ils sont facilement enlevés du milieu suite à un traitement à la DNase I, ils possèdent une stabilité plus élevée et leur synthèse est moins dispendieuse que celle des ARN. Dans le but d'obtenir une ligation efficace, il est important de concevoir l'ADN d'appariement de manière à former un appariement consécutif, sans renflement, ni brèche, ni présence de nucléotides non-appariés avec les deux fragments d'ARN et ce, surtout à proximité de la jonction à liguer (Figure 15B). Les ADN d'appariement les plus fréquemment utilisés pour la ligation d'ARN sont généralement formés de 20 à 40 nucléotides et s'apparient à la fois aux brins donneur et accepteur (Kurschat, Muller et al. 2005). Par contre, lorsqu'il est impossible de former un tel appariement (par exemple lorsqu'un fragment très court d'ARN doit être ligué), un minimum d'environ 7 paires de bases doivent être formées avec chacun des fragments d'ARN afin d'obtenir un substrat permettant une ligation efficace.

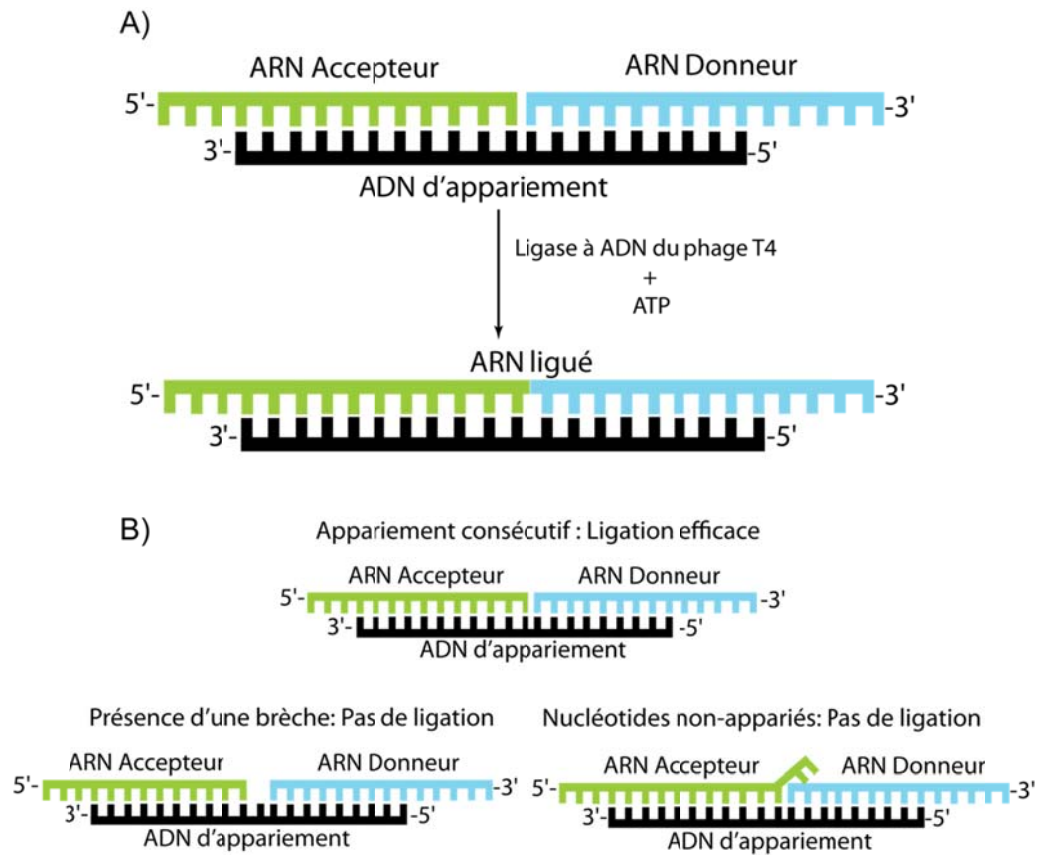


Figure 15 : Ligation d'ARN par ligase à ADN du phage T4.

Représentation des substrats nécessaires afin d'effectuer une ligation d'ARN à l'aide de la ligase à ADN du phage T4. **A)** Représentation schématique de la réaction de ligation. **B)** Conception de l'ADN d'appariement. Un appariement consécutif entre les fragments d'ARN à liguer et l'ADN d'appariement permet une ligation efficace, tandis que la présence d'une brèche ou de nucléotides non-appariés vient inhiber la réaction. L'ARN accepteur (vert), l'ARN donneur (bleu) et l'ADN d'appariement (noir) sont représentés.

De plus, les fragments d'ARN à liguer doivent posséder des groupements précis à leurs extrémités pour que l'enzyme puisse catalyser la réaction. L'ARN accepteur doit

présenter une extrémité 3'-hydroxyle, tandis que l'ARN donneur doit posséder une extrémité 5'-monophosphate. La présence de tout autre groupement à ces extrémités inhibe complètement la ligation (Moore 1999).

Ce type de ligation présente différents avantages et inconvénients. Tout d'abord, le design de l'ADN d'appariement est simple et évite la formation de sous-produits de ligation (formation d'ARN circulaires, ligation de mauvaises extrémités). De plus, l'identité des nucléotides à la jonction n'affecte pas les rendements de ligation. Par contre, les rendements obtenus sont relativement faibles (20 % à 50 %), la réaction est lente (6 à 18 heures de réaction) et nécessite de grandes quantités d'enzyme (Frilander and Turunen 2005). Un traitement additionnel à la DNase doit être effectué suite à la ligation afin d'enlever l'ADN d'appariement. De plus, il est impossible de liguer de petits fragments d'ARN (< 6 nucléotides), car ceux-ci s'apparient mal avec l'ADN, ce qui inhibe la ligation médiée par la ligase à ADN du phage T4.

1.7.2.2. Utilisation de la ligase à ARN 1 du phage T4

Tout comme la ligase à ADN, la ligase à ARN 1 du phage T4 est une enzyme ATP-dépendante qui catalyse la formation d'une liaison phosphodiester entre un fragment d'ARN donneur comportant une extrémité 5'-monophosphate et un fragment d'ARN accepteur présentant un groupement hydroxyle à son extrémité 3'. Toutefois, les substrats de la ligase à ARN 1 doivent obligatoirement être simples brins pour qu'il y ait ligation. Différentes stratégies peuvent être adoptées, employant ou non un acide nucléique d'appariement.

1.7.2.2.1. Ligase à ARN 1 du phage T4 sans utilisation d'ADN d'appariement

Lorsque l'un des fragments d'ARN à liguer est trop court ou qu'il est simplement impossible d'utiliser un ADN d'appariement, la ligase à ARN 1 du phage T4 peut être utilisée afin d'effectuer la ligation d'ARN simples brins (Figure 16). Toutefois, en absence d'ADN d'appariement, les fragments à liguer ne sont pas rapprochés, ce qui ne permet pas de dicter sur quelles extrémités la ligation doit être effectuée. La présence d'un fragment d'ARN contenant à la fois une extrémité 3'-hydroxyle et une extrémité 5'-monophosphate peut alors mener à la formation d'ARN cycliques ou d'homodimères (Persson, Willkomm et al. 2005). Afin d'éviter la production de ces sous-produits, il faut protéger les groupements terminaux des fragments afin de les rendre non-réactifs. Pour ce faire, plusieurs modifications peuvent être apportées. Par exemple, un ribozyme auto-clivable peut être introduit en 3' du fragment donneur lors de sa purification afin de former une extrémité 2'3'-phosphate cyclique, qui n'est pas compatible avec la ligation enzymatique. Le fragment accepteur peut aussi être protégé, par exemple en effectuant un traitement à la phosphatase alcaline, qui transforme une extrémité 5' mono-, di- ou tri-phosphate en extrémité 5'-hydroxyle, non-compatible avec la ligation enzymatique.

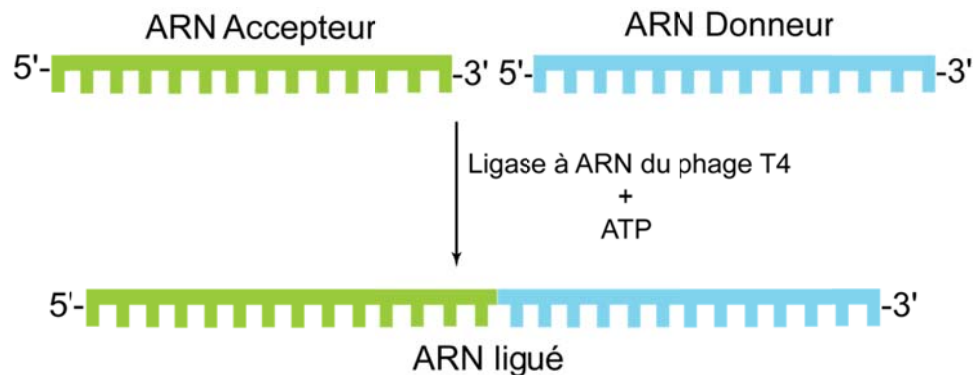


Figure 16 : Ligase à ARN 1 du phage T4 sans l'utilisation d'ADN d'appariement.

Schématisation de la ligation d'ARN à l'aide de la ligase à ARN 1 du phage T4, sans l'utilisation d'un ADN d'appariement.

Les ligations médiées par la ligase à ARN 1 du phage T4 procurent des rendements variant de 30 % à 80 %, en fonction de la séquence des fragments à liguer. L'efficacité de ligation est surtout affectée par l'identité des nucléotides adjacents au site de ligation. Les rendements diminuent selon l'ordre suivant : $C > U \approx A > G$, où les lettres correspondent au ribonucléotide terminal en 5' de l'ARN donneur. De plus, l'efficacité de ligation diminue en fonction de l'identité du résidu terminal à l'extrémité 3' du fragment accepteur, selon l'ordre suivante: $A > C \geq G > U$ (Romaniuk, McLaughlin et al. 1982).

Bref, la ligase à ARN 1 du phage T4 peut être utilisée afin de liguer des ARN sans l'utilisation d'ADN d'appariement. La réaction catalysée est plus rapide (2 à 3 heures) et nécessite moins d'enzyme qu'une ligation à l'ADN ligase. De plus, elle permet la ligation de petits fragments d'ARN (< 6 nucléotides) et procure de bons rendements de ligation. Cependant, ces rendements sont grandement affectés par l'identité des nucléotides à la jonction de ligation et cette technique requiert des manipulations additionnelles afin d'éviter la formation de sous-produits.

1.7.2.2.2. Ligase à ARN 1 du phage T4 avec utilisation d'ADN d'appariement

Récemment, le laboratoire Rader a établi un nouveau protocole de ligation des ARN qui utilise la ligase à ARN 1 du phage T4, jumelée à un ADN d'appariement conçu afin d'imiter le substrat naturel de l'enzyme, l'ARNt de la lysine (Stark, Pleiss et al. 2006). Suite à l'infection par le bactériophage T4, la cellule hôte déclenche un processus de défense menant à la coupure de la boucle de l'anticodon de l'ARNt^{Lys} à un site précis. La ligase à ARN 1 du phage permet alors de contrer ce mécanisme en réparant la boucle de l'anticodon. Le substrat ARNt^{Lys} naturel est caractérisé par une jonction de ligation présentant un segment simple brin de 5 nucléotides sur le fragment accepteur, ainsi qu'un segment simple brin de 2 nucléotides sur le fragment donneur [Figure 17A; (Amitsur, Levitz et al. 1987)]. L'ADN d'appariement est donc conçu afin de former des paires de bases avec les deux fragments d'ARN, tout en laissant des extrémités simples brins de part et d'autres du site de ligation (Figure 17B). La longueur de la région simple brin peut être optimisée pour différentes molécules d'ARN. Cependant, la majorité des réactions fonctionnent efficacement en utilisant des segments simples brins de 5 et de 2 nucléotides, comme chez le substrat naturel. L'utilisation de l'ADN d'appariement procure de meilleurs rendements de ligation, variant entre 50 % et 80 %.

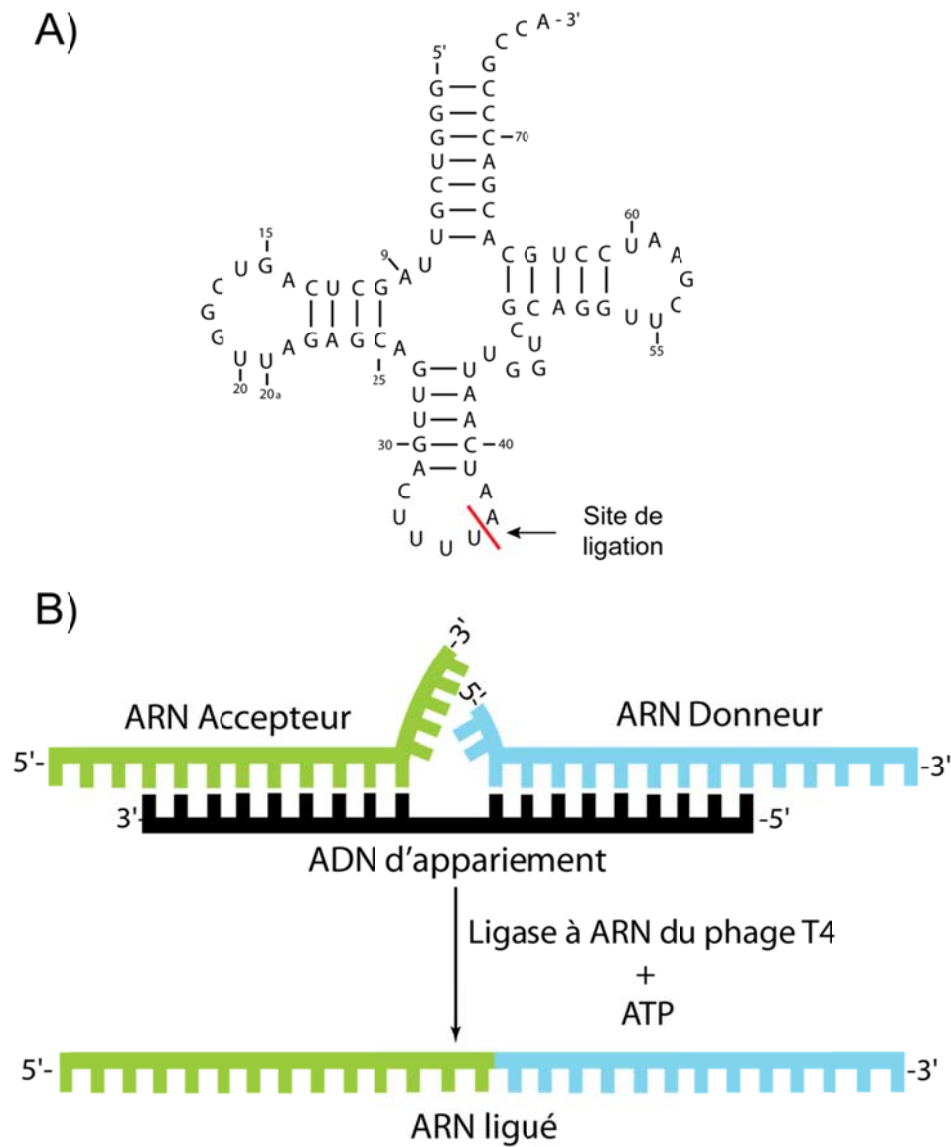


Figure 17 : Ligase à ARN 1 du phage T4 avec l'utilisation d'un ADN d'appariement.

A) Illustration du substrat naturel de la ligase à ARN 1 : un ARNt de la lysine. Le site de clivage entre les résidus 36 et 37 a été étudié par Stark et ses collègues afin d'optimiser la ligation à l'aide d'un ADN d'appariement. Une région simple brin de 5 nucléotides à l'extrémité 3' de l'ARN accepteur, ainsi qu'une région de 2 nucléotides à l'extrémité 5' de l'ARN donneur sont présentes au site de ligation. Le site de clivage causé par l'infection du

phage T4 est représenté en rouge. **B)** Ligation de deux fragments d'ARN à l'aide de la ligase à ARN 1 du phage T4 et d'un ADN d'appariement. L'ADN d'appariement est conçu afin d'imiter les régions simples brins présentes au site de ligation chez le substrat naturel, l'ARNt de la lysine. Adapté de (Persson, Willkomm et al. 2005).

En plus d'améliorer les rendements de ligation, l'utilisation d'un ADN d'appariement semble aussi abolir la restriction de séquence de part et d'autre de la jonction de ligation. Le rapprochement des fragments en utilisant un ADN d'appariement simple brin permet aussi d'éliminer la formation de sous-produits de ligation, lorsque tout l'ARN à liguer est sous forme de complexe ARN-ADN d'appariement. Cette méthode présente donc plusieurs avantages par rapport à l'utilisation de l'enzyme sans ADN d'appariement. La longueur minimale des fragments d'ARN doit toutefois être encore plus grande que pour l'utilisation de la ligase à ADN, car un minimum de 7 nucléotides appariés sur chacun des fragments doivent être présent, en plus de laisser les extrémités de la jonction de ligation simples brins.

1.7.2.3. Utilisation de la ligase à ARN 2 du phage T4

La ligase à ARN 2 du phage T4 est moins spécifique que les deux ligases vues précédemment. Elle catalyse la formation d'une liaison phosphodiester entre des extrémités 3'-hydroxyle et 5'-monophosphate d'ARN doubles ou simple brins. Cette ligase possède toutefois une activité dix fois plus élevée envers l'ARN double brin (Nandakumar, Ho et al. 2004; Nichols, Tabor et al. 2008). Sa capacité à liguer différents fragments d'ARN représente un inconvénient majeur lorsque employée pour la ligation d'ARN. En effet, un ADN d'appariement doit être conçu afin de rendre les fragments doubles brins, comme lors d'une ligation à la ligase à ADN T4, en plus de protéger les extrémités qui ne doivent pas

être liguées, comme lors de l'utilisation de la ligase à ARN 1. La ligase à ARN 2 du phage T4 est donc très rarement utilisée afin de liguer deux fragments d'ARN. Cependant, elle est utilisée plus fréquemment afin de créer des molécules chimères, contenant à la fois des nucléotides d'ARN et d'ADN.

1.7.2.4. Utilisation de ligases DNAzymes

À titre d'alternative aux ligases protéiques, le laboratoire Silverman a conçu deux enzymes à ADN par sélection *in vitro*. Ces DNAzymes permettent la formation d'une liaison phosphodiester entre une extrémité 5'-triphosphate et une extrémité 2'3'-diol sur deux fragments d'ARN simples brins [Figure 18; (Hobartner and Silverman 2007)]. L'utilisation de ces enzymes est toutefois limitée, car le DNAzyme 9DB1 permet l'obtention de bons rendements de ligation (~70 %), mais la réaction doit être effectuée à pH 9,0 et à haute concentration en Mg^{2+} , ce qui favorise la dégradation non-spécifique de l'ARN. De plus, puisque les fragments d'ARN donneur et accepteur ne présentent généralement pas de structures secondaires stables, les risques de dégradation sont encore plus élevés. Ces conditions expérimentales représentent donc un problème majeur. Pour sa part, le DNAzyme 7DE5 réagit sous des conditions moins extrêmes, mais présente des rendements de ligation plus faibles [~ 40 %; (Purtha, Coppins et al. 2005)]. Ces enzymes à ADN représentent une alternative intéressante aux ligases du phage T4, mais nécessitent d'être optimisée davantage afin d'obtenir de meilleurs rendements sous des conditions qui ne favorisent pas la dégradation des ARN.

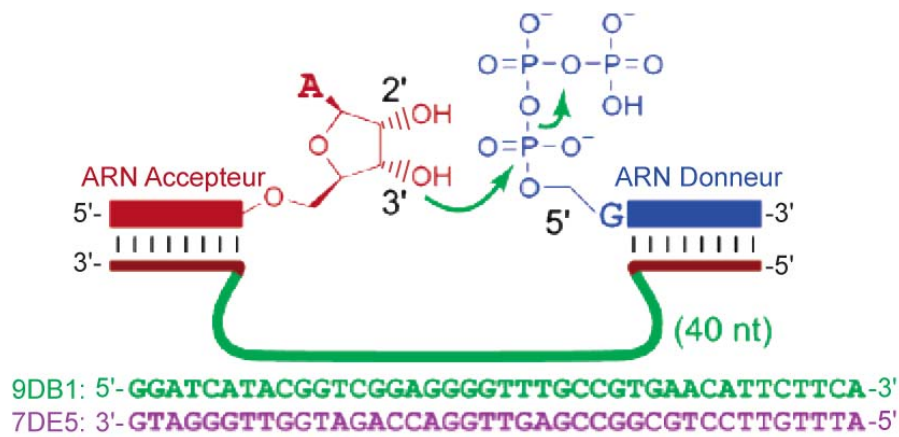


Figure 18 : Ligation d'ARN par DNAzymes.

Les enzymes à ADN 9DB1 et 7DE5 catalysent la formation d'une liaison phosphodiester entre deux fragments d'ARN simples brins. La réaction et les séquences des DNAzymes sont illustrées. Adapté de (Purtha, Coppins et al. 2005).

1.8. Hypothèses et objectifs du projet de recherche

La spectroscopie RMN est une technique très fréquemment utilisée afin d'obtenir la structure tridimensionnelle à haute résolution de macromolécules en solution. Les études de RMN des ARN sont toutefois limitées par deux difficultés majeures. Premièrement, la préparation de grandes quantités (milligrammes) d'ARN repliés de façon native est un processus long et ardu. Comme solution à ce problème, notre laboratoire a développé une technique de purification des ARN par affinité qui utilise une étiquette ARiBo, tel que décrit précédemment (section 1.6.3). La deuxième difficulté associée aux études de RMN des ARN est le grand recouvrement des signaux présents sur les spectres, qui complique grandement leur attribution. Plus l'ARN étudié contient de nucléotides, plus ce

recouvrement est intense, ce qui rend l'obtention de structures tridimensionnelles à haute résolution très complexe pour des ARN plus grands que 15 kDa (~50 nt), lorsque des méthodes de RMN conventionnelles sont utilisées. La solution émergente à ce problème est le marquage isotopique segmentaire ou spécifique des ARN (section 1.3.4). Les protocoles élaborées jusqu'à maintenant sont toutefois très coûteux, requièrent plusieurs semaines de manipulation en laboratoire et procurent de faibles rendements.

L'objectif principal des travaux présentés dans ce mémoire est donc d'explorer la possibilité d'utiliser la méthode de purification des ARN par affinité avec l'étiquette ARiBo, afin d'élaborer une nouvelle technique de marquage isotopique spécifique des ARN fonctionnels.

La molécule modèle utilisée pour l'élaboration de cette technique est le riborégulateur à adénine mutant U65C (RSA). Cette molécule représente un modèle idéal de marquage isotopique sélectif, car elle est composée de 69 nucléotides (~23,5 kDa) et le marquage spécifique du résidu G39 à l'aide de l'isotope ^{15}N , permettra de simplifier les spectres RMN et ainsi, d'attribuer sans ambiguïté ce résidu qui joue un rôle essentiel chez RSA.

Quelques objectifs secondaires devront toutefois être atteints pour permettre l'élaboration d'un tel protocole :

- Développer une stratégie de séparation préparative de nucléotides marqués isotopiquement en ^{13}C et/ou ^{15}N , en se basant sur un protocole de IP-HPLC analytique déjà existant.

- Explorer la capacité du ribozyme *glmS* de cliver des substrats présentant différents nucléotides en N-1, dans le but d'utiliser la technique de purification par affinité pour des ARN qui comportent un résidu autre que l'adénine à son extrémité 3'-terminal, comme le fragment d'ARN donneur nécessaire au marquage sélectif du RSA.
- Explorer la possibilité de jumeler la synthèse enzymatique des ARN, la purification par affinité et la ligation enzymatique.

Le projet de recherche présenté dans ce mémoire permettra donc de développer de nouveaux outils biochimiques afin de faciliter les études structurales d'ARN fonctionnels.

2. Matériels et méthodes

2.1. Production des échantillons d'ARN

2.1.1. Obtention des clones ARiBo1 contenant la séquence d'intérêt

Afin de permettre leur transcription sous forme d'ARN de fusion possédant une étiquette ARiBo à leur extrémité 3', les séquences codant pour toutes les molécules d'ARN utilisées dans ce mémoire (section 6.1) ont été insérées à l'intérieur du plasmide pARiBo1, par mutagenèse dirigée, immédiatement en aval du promoteur T7 [5'-TAATACGACTCACTATA-3'; (Di Tomasso, Lampron et al. 2011)]. Suite au séquençage du clone, une préparation de plasmide à moyenne ou à large échelle (~0,5-5,0 mg, selon la quantité d'ARN nécessaire pour l'étude) est obtenue à partir de cultures bactériennes DH5 α (*Invitrogen*). Cette étape est effectuée en suivant le protocole de préparation du manufacturier (*Qiagen*). Les plasmides obtenus sont finalement linéarisés par digestion à l'enzyme de restriction EcoRI (*New England Biolabs*).

2.1.2. Transcription *in vitro* de l'ARN

Les ARN de fusion ARiBo sont ensuite transcrits *in vitro* durant 3 h à 37 °C, en utilisant les conditions de transcription suivantes : 40 mM HEPES pH 8,0, 50 mM DTT (Dithiothréitol), 0,1 % triton X-100, 1 mM spermidine, 4 mM ATP, 4 mM CTP, 4 mM UTP, 4 mM GTP (ou 2 mM GTP et 8 mM GMP), 25 mM MgCl₂, 6 μ g/mL de polymérase à ARN T7 (préparation maison), 3 U/mL d'inhibiteur à ribonucléase RNAsin (*Promega*) et 80 μ g/mL de plasmide ARiBo linéarisé contenant la séquence d'intérêt. La concentration de chacun de ces composés peut être variée afin d'obtenir un rendement de transcription

optimal. Une fois terminée, la réaction est arrêtée en ajoutant une concentration d'EDTA pH 8,0 égale à celle de $MgCl_2$ utilisée lors de la transcription.

2.2. L'étiquette ARiBo

2.2.1. Test de clivage de l'étiquette ARiBo

Afin d'évaluer l'activité de clivage du ribozyme *glmS* présent dans l'étiquette ARiBo, un test de clivage est effectué à partir d'aliqots de la réaction de transcription enzymatique. Plusieurs conditions sont testées, dans le but de déterminer la concentration optimale de GlcN6P à ajouter. La réaction est effectuée à 37 °C en présence de 9 μ M d'ARN provenant de la transcription (~ 15 μ L), 1 à 4 mM de GlcN6P, 10 mM $MgCl_2$ et 20 à 40 mM Tris pH 7,6. Des aliqots sont prélevés après 0, 30, 60, 90 et 120 min d'incubation, afin de suivre la réaction sur un gel de polyacrylamide dénaturant.

2.2.2. Purification des ARN par affinité utilisant l'étiquette ARiBo

Tous les ARN produits dans ce mémoire ont été purifiés à l'aide de la technique de purification par affinité utilisant l'étiquette ARiBo, décrite précédemment [section 1.5.3; (Di Tomasso, Dagenais et al. 2012)]. Dans un premier temps, un volume de transcription correspondant à 7 nmol d'ARN de fusion ARiBo est incubé durant 15 min, en présence de 35 nmol de protéine de fusion N λ -GST. Le mélange ARN-protéine est ensuite ajouté à 325 μ L de résine GSH-Sépharose (77 % de résine en suspension) et incubé durant 15 min. Après chacune des étapes subséquentes, le tube est centrifugé à 1 070 g durant 1 min, et le surnageant est prélevé. Trois incubations successives de 5 min sont ensuite effectuées à l'aide d'un tampon de lavage (50 mM HEPES pH 7,5), puis l'ARN d'intérêt est élué en

effectuant l'incubation optimale déterminée lors du test de clivage. Un dernier lavage est finalement effectué à l'aide de 2,5 M NaCl pour évaluer la quantité d'ARN toujours lié à la résine. La quantité de matériel présentée ici correspond à une purification d'ARN à moyenne échelle. Les incubations sont effectuées dans un tube de 1,5 mL, comprenant un volume total de 800 μ L. La taille de ces purifications par affinité peut être augmentée ou réduite proportionnellement afin d'être effectuées à petite ou à large échelle, correspondant à respectivement 1 et 250 nmol d'ARN à purifier. Les incubations autres que l'éluion sont effectuées à 25°C avec une légère rotation.

2.3. Préparation de NMP marqués en ^{15}N

2.3.1. Production d'un mélange de NMP marqué en ^{15}N

Des cultures bactériennes de *E. coli* sont produites en milieu minimal, contenant du chlorure d'ammonium ^{15}N comme seule source d'azote. Les bactéries sont lysées et l'ARNr est isolé par extractions successives au phénol/chloroforme tel que décrit précédemment (Nikonowicz, Sirm et al. 1992). L'ARNr est ensuite hydrolysé en effectuant un traitement à la ribonucléase P1, en ajoutant 50 unités d'enzyme pour 400 mg d'ARNr à 45 °C et en incubant 90 min, en présence de 25 mM d'acétate de sodium pH 5,3 et de 0,1 mM ZnCl_2 dans un volume total de 30 mL. La réaction est suivie par chromatographie sur couche mince (CCM) et arrêtée en introduisant 0,5 mM EDTA pH 8,0 et en chauffant à 90 °C pendant 2 min (Haynie and Whitesides 1990). Une digestion alternative à la nucléase S1 peut aussi être effectuée en ajustant le pH de la réaction à 4,4 à l'aide d'acide formique (0,2 mM ZnCl_2 ; 20 U nucléase S1/mg d'ARNr; 13,33 mg d'ARNr/mL de réaction; 90 min à 45 °C; réaction arrêtée en introduisant 0,5 mM EDTA pH 8,0 et en chauffant à 90 °C pendant 2 min).

2.3.2. Séparation et purification des NMP par HPLC

Tous les protocoles de HPLC présentés dans ce mémoire sont effectués à l'aide d'une colonne préparative Nova-Pak HR (6 μm , 19 x 300 mm; Waters Corporation) à phase inverse (C_{18}), ainsi qu'un système de chromatographie liquide *Biologic DuoFlow* (Bio-Rad) pouvant atteindre un débit allant jusqu'à 10 mL/min. Ce système est aussi équipé d'un détecteur UV à longueurs d'onde multiples pouvant être ajusté à la fois à 254 et à 280 nm et de boucles d'injection de 1 mL, de 2 mL et de 5 mL. Tous les solvants utilisés pour les étapes de HPLC sont préalablement dégazés par filtration sous vide avant d'être incorporé au système.

La séparation des NMP par IP-HPLC est réalisée à l'aide de solvants composés de 100 mM bicarbonate de triéthylamine (TEABC) ou de 5 mM tétrabutylammonium (TBA) et de quantités variables de méthanol. Leur pH est ajusté à 2,3 en utilisant de l'acide formique. La purification des NMP individuels, quant à elle, utilise des tampons composés d'eau doublement-distillée (ddH_2O) et de méthanol. Suite à la purification, les tampons volatils sont éliminés à l'aide d'un évaporateur rotatif. Les NMP individuels sont ensuite resuspendus à l'aide de ddH_2O afin d'obtenir une concentration finale de 100 mM. Le pH de la solution est ensuite ajusté à pH 8,0 en utilisant du NaOH concentré.

2.4. Appariement et ligation d'ARN

2.4.1. Quantification des fragments par densité optique

La quantification des molécules d'ARN est généralement effectuée à partir de leur densité optique à 260 nm. Selon plusieurs compagnies de biotechnologie, une valeur

d'absorbance de $A_{260} = 1$ U correspond à une concentration de 40 $\mu\text{g/mL}$ pour l'ARN simple brin (*Roche, Amersham Biosciences*). Cette valeur peut toutefois varier en fonction du repliement de l'ARN mesuré, car un phénomène d'hypochromicité est causé par la formation de paires de bases (Hartmann, Bindereif et al. 2005). La stratégie employée dans ce mémoire pour établir les ratios d'ARN et d'ADN utilisés lors des tests d'appariements prend en compte ce phénomène. Les molécules d'ARN sont hydrolysées en mononucléotides, grâce à une digestion à la nucléase P1 en présence de 25 mM d'acétate de sodium pH 5,3 et de 0,1 mM ZnCl_2 . La réaction est effectuée en ajoutant 1 U de nucléase P1 à 1 nmol d'ARN et en incubant la réaction à 45 °C durant 2 h. Pour obtenir le coefficient d'extinction molaire (ϵ_{260}) de l'ARN intact, la somme des valeurs de ϵ_{260} pour chacun des nucléotides (Cavaluzzi and Borer 2004) est corrigée par un facteur d'hypochromicité, correspondant au ratio de A_{260} avant et après l'hydrolyse à la nucléase P1. Cette étape de quantification par densité optique doit absolument être effectuée avant la déprotection de l'extrémité 3' chez l'ARN donneur (section 2.4.2), car l'introduction d'ATP à cette étape fausse les valeurs de A_{260} observées.

2.4.2. Protection et déprotection des extrémités du fragment accepteur

Afin d'éviter la formation de sous-produits de ligation et de permettre la ligation enzymatique, les extrémités 3' et 5' de l'ARN accepteur sont modifiées afin qu'elles se terminent par un groupement hydroxyle. Une étape de traitement à la polynucléotide kinase du bactériophage T4 (T4 PNK; *New England Biolabs*) est effectuée pendant 4 h à 37 °C, en ajoutant 3 U d'enzyme par nmol d'ARN purifié en présence de 70 mM HEPES pH 7,6, 10 mM MgCl_2 , 5 mM DTT, 6 mM ATP et de 1 U d'inhibiteur à RNase *RNAsin* (*Promega*) par nanomole d'ARN purifié. La T4 PNK est inactivée par une incubation de 5 min à 65 °C. Un traitement à la phosphatase alcaline de veau (CiP; *Roche*) est effectué par la suite, sous les mêmes conditions réactionnelles, en ajoutant 0,2 U d'enzyme par nmol

d'ARN purifié. La réaction est effectuée pendant 4 h à 37 °C et l'enzyme est inactivée suite à une incubation de 5 min à 65 °C.

2.4.3. Formation des complexes de pré-ligation

2.4.3.1. Tests d'appariement des complexes de pré-ligation

Afin d'évaluer l'appariement des fragments précurseurs avec les ADN d'appariement simples brins, ces molécules sont ajoutées en respectant un ratio déterminé pour la ligation. Par exemple 1:1,5:1,25, correspondant dans l'ordre, au ratio molaire des fragments donneur, accepteur et de l'ADN d'appariement. Les molécules sont ensuite appariées par une approche de dénaturation et de renaturation lente (« *Heat and Slow Cool* »), en chauffant le mélange à une température atteignant environ 10 °C de plus que le T_f (point de fusion) le plus élevé, puis en le plaçant immédiatement à 25 °C. Afin de faciliter l'appariement, les trois molécules peuvent soit être ajoutées simultanément ou soit être appariées de façon successive. Par exemple, le complexe de pré-ligation optimal, servant à la ligase T4 à ADN est formé suite à une incubation de 2 min d'un mélange de RSA3', de RSA5' et d'ADN d'appariement I à 65 °C suivi d'un refroidissement de 10 min à 25 °C. Cet appariement est optimal en présence d'un ratio molaire de brins de 1:1,4:1,75. Quant au complexe de pré-ligation servant à la ligase T4 à ARN 1, il est formé à l'aide de deux réactions de dénaturation et de renaturation lente consécutives. La première comporte une incubation de 2 min de l'ADN d'appariement II et du RSA5' à 95 °C, ainsi qu'un refroidissement à 25 °C durant 10 min. Le RSA3' est alors ajouté au complexe RSA5'-ADN d'appariement II et incubé à 55 °C durant 2 min, puis à 25 °C pour 10 min. Cet appariement est optimal en présence d'un ratio molaire de substrats de 1:1,5:1,75.

2.4.3.2. Mise sur gel natif des complexes de pré-ligation

Suite à l'appariement des fragments précurseurs, une fraction de la solution est chargée sur un gel natif de polyacrylamide 8 % [acrylamide:bisacrylamide (37,5:1)], afin de vérifier la formation du complexe de ligation. Le tampon de chargement contient 2 mM DTT et 10 % glycérol dans de l'eau, tandis que le tampon de migration du gel contient 25 mM Tris pH 9,0 et 200 mM glycine. Les gels sont pré-migrés à 100 V pendant 30 min, puis les échantillons sont chargés et migrés à 250 V durant 2 h, à 4 °C. Les acides nucléiques sont finalement révélés en utilisant une solution de « *Stains All* » (*Sigma-Aldrich*).

2.4.4. Réactions de ligation enzymatique

Dans le but d'optimiser la ligation du riborégulateur mutant U65C, plusieurs réactions de ligation à petite échelle ont été effectuées, en variant le ratio des molécules d'acide nucléique formant le complexe de pré-ligation, la quantité de MgCl₂, d'ATP, de PEG (polyéthylène glycol) et de DTT, ainsi que le type d'enzyme utilisé, la température de la réaction et le temps d'incubation. Ces réactions sont effectuées à l'aide de 0,66 nmol du fragment d'ARN limitant, dans un volume total de 110 µL.

2.4.4.1. Ligation optimale catalysée par la ligase à ADN du phage T4

La ligation optimale du RSA, effectuée à l'aide de la ligase à ADN du phage T4 est obtenue suite à une incubation de 24 h à 37 °C, en présence de 50 mM HEPES pH 7,8, 15 mM MgCl₂, 5 % (v/v) PEG 4000, 10 mM DTT, 3 mM ATP, 1 U de ligase à ADN du

phage T4 par 20 pmol de RSA3', une concentration molaire en ARN limitant de 7,5 pmol/ μ L de réaction et un ratio molaire des brins de 1:1,4:1,75 (RSA3':RSA5':ADN d'appariement I).

2.4.4.2. Ligation optimale catalysée par la ligase à ARN 1 du phage T4

La ligation optimale du RSA, effectuée avec la ligase à ARN 1 du phage T4 est obtenue suite à une incubation de 4 h à 37 °C, en présence de 90 mM HEPES pH 7,8, 15 mM MgCl₂, 4,5 % (v/v) PEG 4000, 10 mM DTT, 3 mM ATP, 1 U de ligase à ARN 1 du phage T4 par 25 pmol de RSA3'-ARiBo, une concentration molaire en ARN limitant de 7,5 pmol/ μ L de réaction et un ratio molaire des brins de 1:1,5:1,75 (RSA3'-ARiBo:RSA5':ADN d'appariement II).

2.5. Ligation sur support solide ARiBo

Les réactions de ligation peuvent aussi être effectuées lorsque le fragment donneur est lié au support solide ARiBo. Pour ce faire, 1 nmol du fragment donneur possédant l'étiquette ARiBo est alors incubé durant 15 min, en présence de 5 nmol de protéine de fusion N λ -GST. Le mélange ARN-protéine est ensuite ajouté à 74 μ L de résine GSH-Sépharose (77 % de résine en suspension) et incubé durant 15 min (SC) à 25 °C avec rotation. Trois incubations successives de 5 min chacune (L1, L2 et L3) sont ensuite effectuées à l'aide d'un tampon de lavage (50 mM HEPES pH 7,5), puis le complexe de pré-ligation est formé en utilisant les conditions d'appariement optimales, déterminées précédemment (section 2.4.3.1). À titre d'exemple, lors de la ligation du RSA à l'aide de la ligase à ARN 1 du phage T4, l'ADN d'appariement II est premièrement apparié au RSA5'

(fragment accepteur) à l'aide d'une incubation de 2 min à 95 °C, suivie d'une incubation à 25 °C durant 10 min. Le complexe RSA5'-ADN d'appariement II est ensuite ajouté au RSA3'-ARiBo, lié au support solide. Une incubation de 2 min à 55 °C, suivie d'une incubation à 25 °C durant 10 min permet de former le complexe de pré-ligation RSA5'-ADN d'appariement II-RSA3', lié au support solide. La réaction de ligation (Lig) peut alors être effectuée en ajoutant l'enzyme et le tampon de ligation, puis en procédant à une incubation de 4 h à 37 °C (section 2.4.4.2). Suite à la ligation, le surnageant est éliminé et deux incubations (L4 et L5) successives de 5 min sont effectuées en utilisant le tampon de lavage. L'ARN d'intérêt est alors élué suite à l'ajout de GlcN6P (E1), un lavage additionnel de 5 min est effectué (E2), puis un dernier lavage (R) est accompli en utilisant une solution de 2,5 M NaCl, afin d'évaluer la quantité d'ARN toujours lié à la résine.

Après chacune des étapes de la ligation sur support solide ARiBo, le tube contenant la résine et l'ARN à purifier est centrifugé à 1 070 g durant 1 min, puis le surnageant est prélevé afin d'être chargé sur un gel analytique de polyacrylamide 10 %. La quantité de matériel présentée ici correspond à une ligation d'ARN sur support solide à petite échelle. Les incubations sont effectuées dans un tube de 500 µL, comportant un volume total (tampon et résine) d'environ 200 µL. La taille de ces réactions peut être augmentée proportionnellement afin d'être effectuées à large échelle, dans un tube de 50 mL, afin de lier jusqu'à 100 nmol d'ARN par réaction. Les incubations autres que l'élution sont effectuées à 25°C avec une légère rotation.

2.6. Quantification d'ARN révélée au *SYBR Gold*

Suite aux purifications par affinité et aux réactions de ligation, les échantillons sont chargés sur des gels de polyacrylamide 10 ou 20 % [acrylamide:bisacrylamide (37,5:1)],

contenant 7 M d'urée comme agent dénaturant. La migration est effectuée durant 2 h à 425 V, puis les gels sont colorés en utilisant une solution de *SYBR Gold* (*Invitrogen*; dilution 1:10 000 dans un tampon TBE contenant 200 mM Tris-Base, 200 mM acide borique et 4 mM EDTA). L'ARN est révélé en utilisant un densitomètre, le *Molecular Imager FX* (*Bio-Rad*) et l'intensité des bandes est enregistrée à l'aide du logiciel *ImageLab* (version 3.0, *Bio-Rad*).

Afin de quantifier les bandes d'intérêt, différentes quantités pré-établies d'ARN (section 2.4.1) sont chargées sur chacun des gels, dans le but d'établir une courbe mettant en relation l'intensité des bandes et la quantité d'un ARN donné. La bande correspondant à l'ARN d'intérêt peut alors être quantifiée. Pour les réactions de ligation, les rendements sont calculés à partir de l'équation suivante : $[\text{Rendement}_{\text{Ligation}} = (\text{ARN}_{\text{ligué}}/\text{ARN}_{\text{donneur}}) \times 100]$, les ARN étant mesurés en nmol], où le fragment d'ARN donneur est limitant. Pour ce qui est des purifications par affinité, le rendement est défini par l'équation suivante : $[\text{Rendement}_{\text{Purification}} = (\sum \text{ARN}_{\text{élutions}}/\text{ARN}_{\text{non-purifié}}) \times 100]$, les ARN étant mesurés en nmol], tandis que la pureté de l'échantillon obtenu est calculée à l'aide de celle-ci : $[\text{Pureté} = (\sum \text{ARN}_{\text{élutions}})/(\sum \text{ARN}_{\text{élutions}} + \sum \text{ARN}_{\text{impuretés}}) \times 100]$, les ARN étant mesurés en µg], où $\text{ARN}_{\text{élutions}}$ et $\text{ARN}_{\text{impuretés}}$ correspondent respectivement à la quantité d'ARN d'intérêt et de contaminants présents dans chacune des fractions d'élution et $\text{ARN}_{\text{non-purifié}}$ correspond à la quantité d'ARN d'intérêt provenant de la transcription, au début de la purification. Le pourcentage de clivage est quant à lui calculé à partir de l'équation suivante : $[\% \text{ clivage} = ((I_{\text{ARiBo}} + I_{\text{intérêt}})/I_{\text{initiale}}) \times 100]$, où I_{ARiBo} , $I_{\text{intérêt}}$ et I_{initiale} correspondent respectivement à l'intensité de la bande associée à l'étiquette ARiBo, au produit d'intérêt clivé (par exemple, le RSA) et au substrat initial (par exemple, le RSA-ARiBo).

2.7. Production et purification de la ligase à ARN 1 du phage T4

Un protocole établi au laboratoire Unrau est utilisé afin de produire et de purifier de grandes quantités de ligase à ARN 1 du phage T4 (Wang and Unrau 2002). Dans un premier temps, la protéine de fusion contenant la ligase à ARN 1, ainsi qu'une étiquette de poly-histidines (plasmide *pRHT4*), est surexprimée dans des cellules bactériennes *BL21 (DE3)*. La protéine est ensuite extraite et purifiée sur une colonne d'affinité au nickel en utilisant des tampons de lavage composés de 50 mM KH_2PO_4 ; 10 mM $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$; 300 mM NaCl et de 10 mM à 100 mM Imidazole à pH 8,0, puis par FPLC à l'aide d'une colonne échangeuse de cations. L'enzyme est finalement entreposé dans un tampon composé de 25 mM HEPES pH 7,5, de 2 mM DTT, de 0,1 mM EDTA et de 50 % glycérol. Ce protocole permet de produire et de purifier environ 80 mg (~ 960 000 U) de ligase à ARN 1 du phage T4, lorsqu'une culture bactérienne de 8 L est utilisée.

3. Résultats

Les travaux présentés dans cette section ont mené à l'élaboration d'un nouveau protocole de marquage isotopique spécifique des ARN fonctionnels. Les résultats obtenus sont exposés en trois parties distinctes. Premièrement, un protocole de séparation préparative de NMP marqués isotopiquement en ^{15}N a été développé. Ce protocole permet une séparation rapide et efficace d'un mélange de NMP par IP-HPLC. Ces travaux seront publiés sous peu dans *Methods in Molecular Biology* (Dagenais and Legault 2012). Ensuite, diverses séquences d'attache ont été testées, dans le but de déterminer une condition d'élution permettant de purifier des ARN à l'aide de la technique de purification par affinité ARiBo, sans restriction de séquence à leur extrémité 5'. Ces résultats ont été publiés dans *Nucleic Acids Research* (Di Tomasso, Lampron et al. 2011). Finalement, la possibilité de jumeler la synthèse enzymatique d'ARN, la purification par affinité ARiBo, ainsi que la ligation enzymatique a été explorée afin d'effectuer un marquage isotopique spécifique du résidu G39 chez le riborégulateur à adénine mutant U65C (RSA).

3.1. Développement d'un protocole de séparation préparative des NMP

Plusieurs protocoles déjà existants permettent d'obtenir un mélange de NMP marqués isotopiquement (section 1.4.1). Cependant, il n'existe jusqu'à maintenant, qu'un seul protocole détaillé permettant la séparation préparative d'un tel mélange en échantillons purs de CMP, d'AMP, de GMP et d'UMP (Batey R.T., Battiste et al. 1995). Bien qu'il soit très utile, ce protocole est limité par une étape de purification laborieuse qui nécessite plusieurs jours de travail en laboratoire. Il est donc difficile d'utiliser cette stratégie de séparation sur une base régulière. L'utilisation d'un protocole de séparation préparative alternatif, permettant l'obtention rapide de matériel pur et compatible avec la synthèse enzymatique, serait donc grandement avantageuse pour les études de marquage isotopique d'ARN.

3.1.1. Adaptation d'un protocole de séparation analytique des NMP

L'adaptation d'un protocole de séparation des NMP par chromatographie en phase liquide à haute performance en phase inverse, avec pairage d'ions (IP-HPLC), a donc été amorcée, en se basant sur les travaux de chimie analytique du laboratoire Goldberg (Walseth, Graff et al. 1980). Afin de diminuer les coûts associés à la production de nucléotides, les étapes d'optimisation initiales ont été réalisées à partir d'un mélange de NMP commercial non-marqué, contenant chacun des quatre nucléotides (CMP, AMP, GMP et UMP) en proportions égales.

3.1.1.1. Choix de l'agent de pairage ionique

Dans un premier temps, plusieurs agents de pairage ionique ont été testés afin de déterminer l'agent optimal, permettant la meilleure séparation des quatre NMP. Lors du développement d'un protocole préparatif par HPLC, il est toujours préférable d'utiliser des solvants volatils, car ce type de solvant peut facilement être éliminé du produit désiré par évaporation (Harding, Bishop et al. 1981). Le bicarbonate de triéthylamine (TEABC) a donc été choisi comme agent de pairage ionique pour les tests de séparation initiaux par IP-HPLC. L'utilisation de ce solvant volatil (Palmer and Avruch 1981) procure une séparation de haute résolution des quatre composantes du mélange de NMP à l'échelle analytique (Walseth, Graff et al. 1980; Ip, Ha et al. 1985; Uesugi, Sano et al. 1997). De plus, un profil similaire est perçu lorsqu'une petite quantité ($< 10 \mu\text{moles}$) du mélange de NMP est injectée sur une colonne de HPLC préparative en phase inverse. Cependant, une perte de résolution drastique, perçue par l'élargissement de chacun des pics du chromatogramme, est observée lorsque plus de $15 \mu\text{moles}$ du mélange de NMP sont injectés sur la colonne

préparative (Figure 19A). L'optimisation de la concentration et du pH de chacun des solvants, ainsi que de la température et des gradients d'élution utilisés, n'ont pas permis de résoudre ce problème d'élargissement des pics. Il est donc impossible d'atteindre une séparation préparative ($> 125 \mu\text{moles/injection}$) des NMP à l'aide du TEABC, car l'augmentation de la concentration du mélange injecté provoque un chevauchement des pics du chromatogramme.

L'utilisation de l'hydroxyde de tétrabutylammonium (TBA) comme agent de pairage d'ions pour la séparation des NMP a ensuite été testée. Cet agent de pairage ionique non-volatil lorsque associé aux NMP, procure une séparation de haute résolution lorsque $15 \mu\text{moles}$ du mélange de NMP est injecté sur la colonne de HPLC (Figure 19B). Ces résultats préliminaires prometteurs permettent d'envisager la possibilité d'obtenir une séparation préparative des NMP en utilisant le TBA comme agent de pairage ionique.

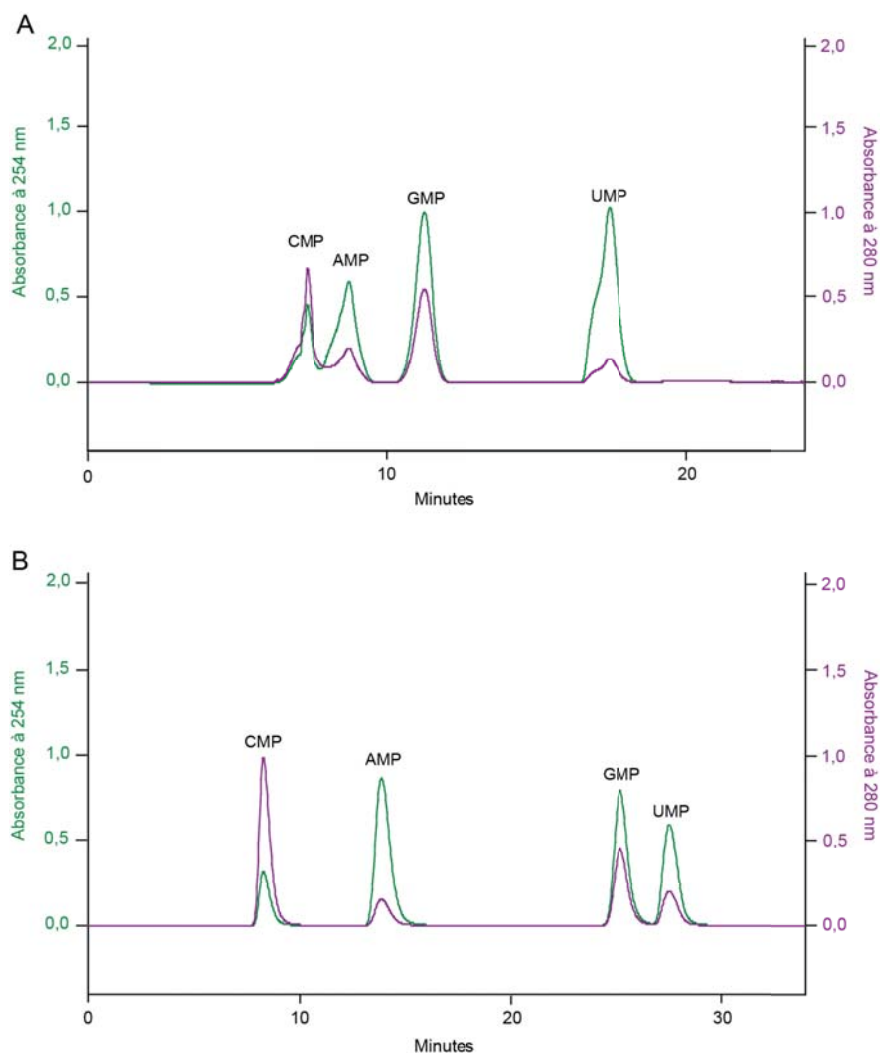


Figure 19 : Séparation des NMP en utilisant différents agents de pairage ionique.

Chromatogrammes de séparation d'un mélange commercial de 15 μmoles de NMP (CMP, AMP, GMP et UMP) par IP-HPLC. La séparation est effectuée à l'aide de solvants contenant du TEABC (A) ou du TBA (B) comme agent de pairage ionique. Dans chacun des cas, les conditions expérimentales ont été optimisées afin d'obtenir la meilleure séparation possible. L'absorbance est enregistrée à 254 nm (vert) et à 280 nm (mauve).

3.1.1.2. Optimisation de la séparation des quatre NMP

Une optimisation de la concentration de TBA, du pH utilisé, ainsi que du gradient d'élution a ensuite été réalisée, dans le but d'obtenir une séparation préparative du mélange contenant chacun des quatre NMP. L'utilisation d'un solvant A contenant 5 mM TBA ajusté à pH 2,3 à l'aide d'acide formique, ainsi que d'un solvant B contenant 25 % (v/v) méthanol dans le solvant A, permet d'atteindre une séparation de haute résolution pour un mélange de 125 μ moles de NMP commercial (Figure 20).

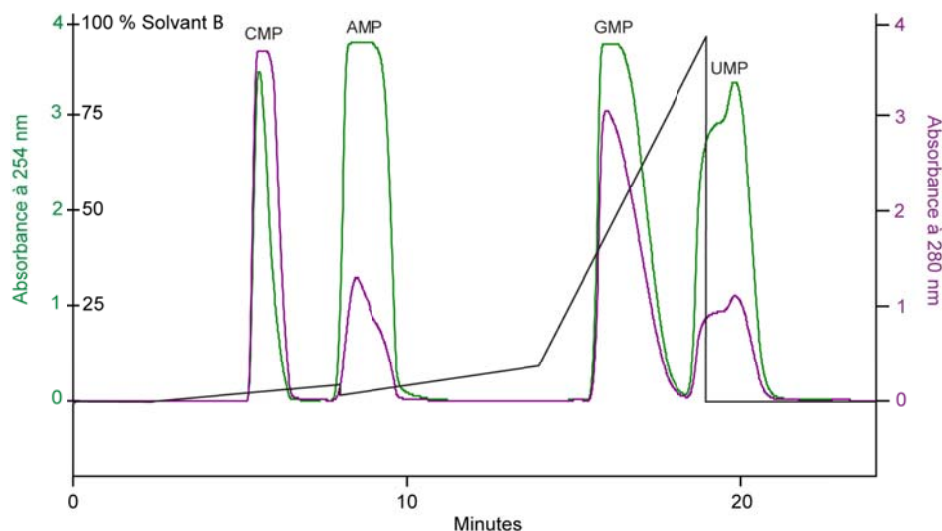


Figure 20 : Séparation préparative de NMP par IP-HPLC.

Chromatogramme de séparation préparative (125 μ moles) d'un mélange de NMP commercial. Le gradient d'élution multi-linéaire [% solvant B, ligne noir : **1**) 0 % solvant B pour 20 mL; **2**) 0 % à 5 % solvant B pour 60 mL; **3**) 2 % à 10 % solvant B pour 60 mL; **4**) 10 % à 100 % solvant B pour 50 mL; et **5**) 0 % solvant B pour 50 mL] est effectué en utilisant un solvant A (5 mM TBA pH 2,3 ajusté avec de l'acide formique) et un solvant B [25 % (v/v) méthanol dans le solvant A] à un débit de 10 mL/min. L'absorbance est enregistrée à 254 nm (vert) et à 280 nm (mauve).

Ce protocole a par la suite été utilisé afin de séparer un mélange de NMP marqués en ^{15}N , produit en laboratoire (section 1.4). Étonnamment, le chromatogramme obtenu suite à l'injection de 100 μmoles de ce mélange (Figure 21A) diffère considérablement de celui obtenu à partir de NMP commerciaux (Figure 20). En effet, ce protocole procure une séparation adéquate du CMP et du AMP, sans toutefois permettre de séparer le GMP du UMP et ce, même si toutes les conditions utilisées pour la séparation (solvants, gradient multi-linéaire, température et débit) sont identiques à celles utilisées à la Figure 20. La seule différence notée réside dans le tampon contenant le mélange de nucléotides injecté, car les NMP commerciaux sont préalablement dilués dans l'eau avant d'être injectés sur la colonne de HPLC, tandis que les NMP produits en laboratoire proviennent généralement d'une étape de digestion à la nucléase P1 et contiennent 0,1 mM ZnCl_2 , ainsi que 25 mM d'acétate de sodium (NaAc) à pH 5,3 (Haynie and Whitesides 1990; Nikonowicz, Sirr et al. 1992).

Afin de déterminer quel constituant du tampon de digestion affecte la séparation des NMP, deux séparations de mélanges commerciaux différents ont été effectuées. L'un, contenant 0,1 mM ZnCl_2 , et l'autre contenant 25 mM NaAc à pH 5,3. La présence d'une faible concentration de ZnCl_2 n'affecte aucunement la séparation des nucléotides et procure un chromatogramme identique à celui de la Figure 20 (résultat non montré). Cependant, la présence de 25 mM NaAc pH 5,3 dans l'échantillon de NMP injecté affecte grandement la séparation du GMP de l'UMP (Figure 21B). Le chromatogramme obtenu est donc semblable à celui de la Figure 21A.

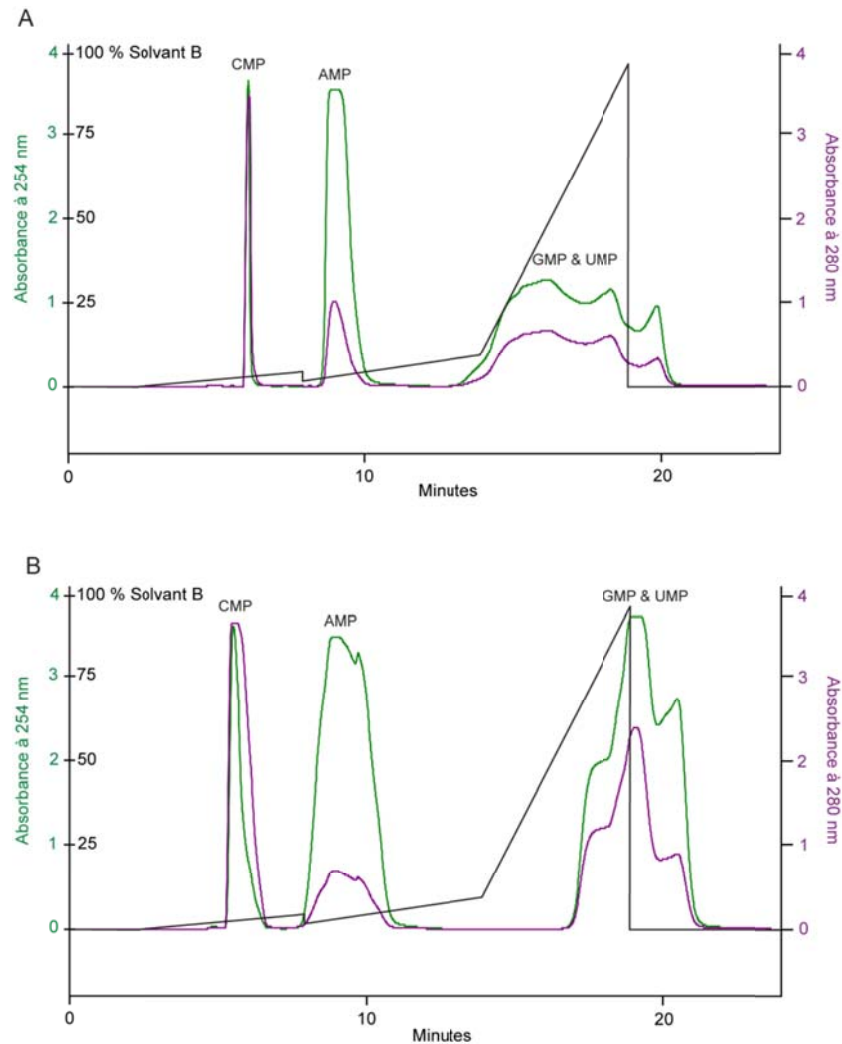


Figure 21 : Séparation des NMP en présence du tampon de digestion à la nucléase P1. Chromatogrammes de séparation de 100 μ moles d'un mélange de **A)** NMP ^{15}N produits en laboratoire et de **B)** NMP non-marqués commerciaux contenant 25 mM NaAc pH 5,3. Le gradient d'éluion multi-linéaire [% solvant B, ligne noire : **1)** 0 % solvant B pour 20 mL; **2)** 0 % à 5 % solvant B pour 60 mL; **3)** 2 % à 10 % solvant B pour 60 mL; **4)** 10 % à 100 % solvant B pour 50 mL; et **5)** 0 % solvant B pour 50 mL] est effectué en utilisant un solvant A (5 mM TBA pH 2,3 ajusté avec de l'acide formique) et un solvant B [25 % (v/v)

méthanol dans le solvant A] à un débit de 10 mL/min. L'absorbance est enregistrée à 254 nm (vert) et à 280 nm (mauve).

Afin de résoudre le problème causé par la présence de NaAc dans l'échantillon de NMP marqués, la nucléase P1 utilisée lors de l'étape d'hydrolyse de l'ARNr est remplacée par une nucléase S1. Cette enzyme est active en pH acide et permet la dégradation de l'ARNr en NMP, en quelques heures d'incubation à 45 °C (Michnicka, Harper et al. 1993). Une réaction de digestion à la nucléase S1 en présence d'acide formique pourrait alors permettre le clivage de l'ARN dans des conditions compatibles avec la séparation par IP-HPLC. Suite à l'optimisation de cette réaction de digestion enzymatique, des conditions de réaction optimales ont été déterminées [0,2 mM ZnCl₂ ajusté à pH 4,4 à l'aide d'acide formique; 20 U nucléase S1/mg d'ARNr; 13,33 mg d'ARNr/mL de réaction; 90 min à 45 °C; (Dagenais and Legault 2012)]. La nucléase S1 est ensuite inactivée par chauffage à 90 °C pendant 2 minutes, avant d'effectuer la séparation par IP-HPLC.

L'hydrolyse de l'ARNr par digestion à la nucléase S1 permet donc d'obtenir un mélange de NMP exempt de NaAc. Une séparation préparative à haute résolution de l'échantillon de NMP marqué en ¹⁵N peut alors être effectuée [150 µmoles du mélange de NMP; (Figure 22A)], sans interférence du tampon d'injection. Le profil d'élution de cette séparation est très similaire à celui obtenu pour des nucléotides commerciaux (Figure 22B), à l'exception de quelques impuretés provenant des étapes de production des NMP en laboratoire pouvant être aperçues sur le chromatogramme.

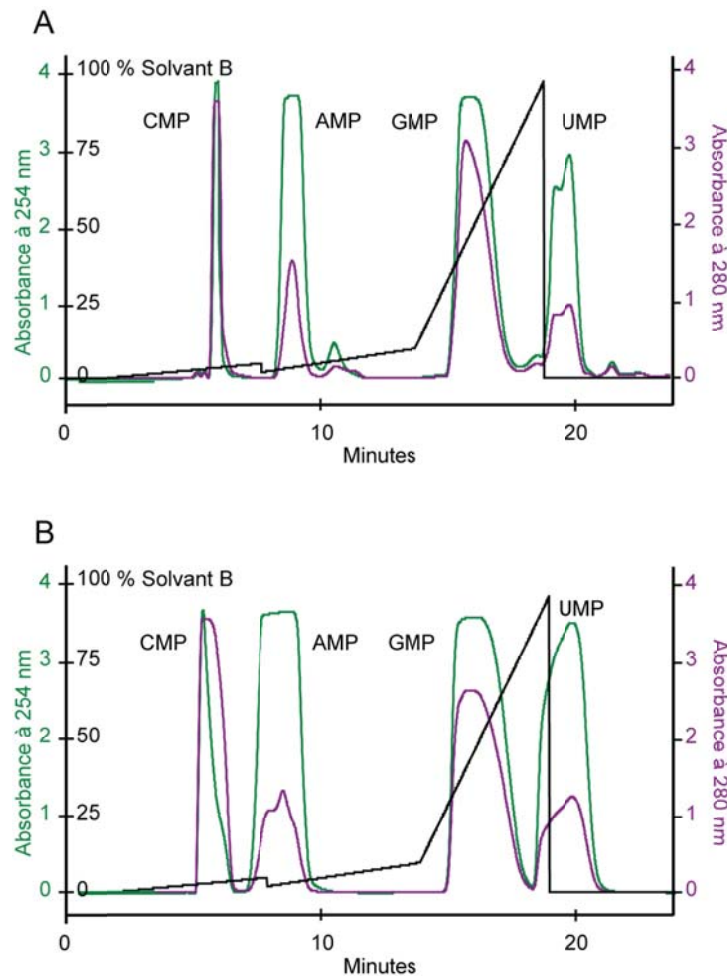


Figure 22 : Séparation préparative optimale d'un mélange de NMP par IP-HPLC.

Chromatogrammes de séparation préparative de 150 μ moles de **A**) l'hydrolysate d'ARNr marqués en ^{15}N suite à une digestion à la nucléase S1 et d'un **B**) mélange de NMP commerciaux. Le gradient d'élution multi-linéaire [% solvant B, ligne noire : **1**) 0 % solvant B pour 20 mL; **2**) 0 % à 5 % solvant B pour 60 mL; **3**) 2 % à 10 % solvant B pour 60 mL; **4**) 10 % à 100 % solvant B pour 50 mL; et **5**) 0 % solvant B pour 50 mL] est effectué en utilisant un solvant A (5 mM TBA pH 2,3 ajusté avec de l'acide formique) et un solvant B [25 % (v/v) méthanol dans le solvant A] à un débit de 10 mL/min. L'absorbance est enregistrée à 254 nm (vert) et à 280 nm (mauve). Adapté de (Dagenais and Legault 2012).

Suite à la séparation préparative, les fractions comportant chacun des NMP sont concentrées par évaporation. Cette étape permet d'éliminer l'eau et le méthanol provenant des solvants de IP-HPLC. Cependant, le TBA utilisé comme agent de pairage ionique ne peut être éliminé par évaporation. Ce composé est volatil sous forme hydroxyde, mais forme possiblement des sels stables avec les groupements phosphates des NMP. Le TBA est donc toujours présent en haute concentration à l'intérieur des échantillons de NMP, ce qui inhibe la transcription enzymatique à la polymérase T7 (Dagenais and Legault 2012). Une étape subséquente de purification de chacun des échantillons de NMP doit alors être effectuée afin d'éliminer ce contaminant et de permettre la synthèse d'ARN.

3.1.2. Protocole de purification des NMP individuels par HPLC en phase inverse

Un protocole de HPLC permettant la purification de chacun des NMP a ensuite été développé, afin d'éliminer le TBA provenant de leur séparation. L'utilisation d'une colonne en phase inverse, ainsi que de solvants complètement volatils (ddH₂O et méthanol) permet de purifier chacun des quatre nucléotides obtenus par IP-HPLC. Ce nouveau protocole de purification des NMP par HPLC permet d'obtenir de 50 à 100 µmoles de CMP, AMP, GMP ou UMP exempt de TBA, en moins de 25 minutes (Figure 23).

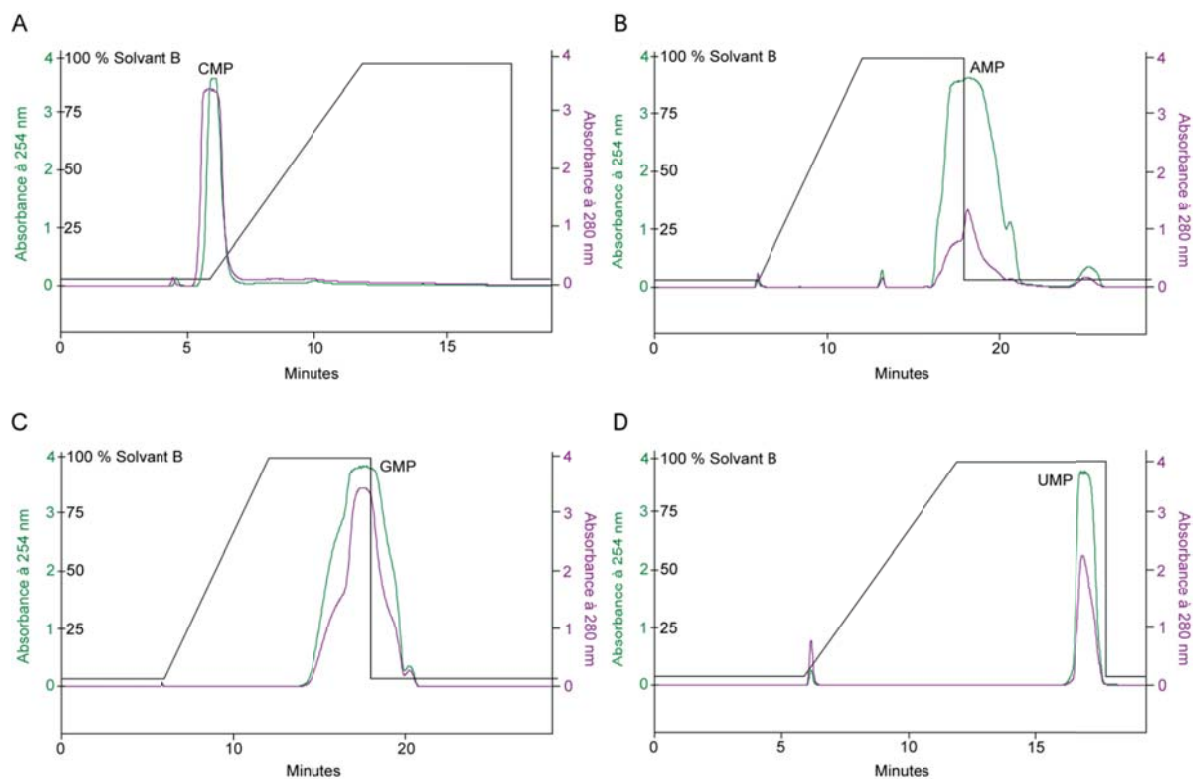


Figure 23 : Purification de chacun des NMP par HPLC en phase inverse.

Chromatogrammes de purification d'échantillons marqués en ^{15}N de **A) CMP**, **B) AMP**, **C) GMP** et **D) UMP**, suite à leur séparation par IP-HPLC. Des injections de 50 μmoles (16 mg) d'échantillons de CMP et de UMP, ainsi que de 100 μmoles (35 mg) d'échantillons de AMP et de GMP ont été effectuées. Le gradient d'éluion multi-linéaire [% solvant B, ligne noir : **1)** 4 % solvant B pour 60 mL; **2)** 4 % à 100 % solvant B pour 60 mL; **3)** 100 % solvant B pour 60 mL; et **4)** 4 % solvant B pour 50 mL] est effectué en utilisant un solvant A (ddH₂O) et un solvant B [50 % (v/v) méthanol dans le solvant A] à un débit de 10 mL/min (Dagenais and Legault 2012). L'absorbance est enregistrée à 254 nm (vert) et à 280 nm (mauve).

L'utilisation successive des protocoles de séparation et de purification permet d'obtenir des échantillons purs de chacun des quatre NMP. De plus, cette stratégie de

séparation préparative est efficace et procure un rendement global d'environ 75 % à 80 %, comme en témoigne l'obtention de 190 μ moles de CMP, 220 μ moles de AMP, 340 μ moles de GMP et de 195 μ moles de UMP purs, à partir d'un mélange de 1200 μ moles de NMP ^{15}N obtenu par digestion à la nucléase S1.

3.1.3. Contrôle de qualité des échantillons de NMP séparés

Afin d'évaluer la qualité de chacun des échantillons de NMP obtenus suite aux étapes de HPLC, plusieurs réactions de transcription enzymatique sont réalisées à petite échelle (Figure 24). Comme mentionné plus tôt, l'ajout de 4 mM de AMP, GMP ou UMP provenant de la séparation par IP-HPLC inhibe complètement la synthèse d'ARN. Cependant, l'ajout de ces mêmes échantillons suite à leur purification par HPLC en phase inverse, procure des rendements de transcription semblables à celui de la condition contrôle, comportant aucun NMP ajouté. Ceci démontre donc l'efficacité du protocole de purification développé.

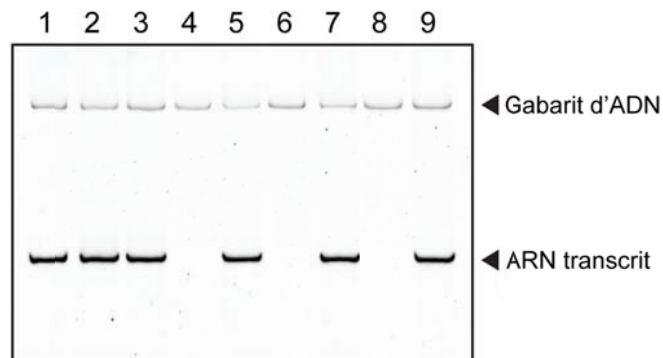


Figure 24 : Contrôle de qualité des échantillons de NMP ^{15}N issus de la séparation par IP-HPLC.

Chacun des échantillons de NMP marqués en ^{15}N est ajouté à une réaction de transcription enzymatique différente. Le produit de chacune de ces réactions est analysé sur un gel de polyacrylamide 10 % dénaturant et révélé à l'aide d'une coloration au *SYBR Gold*. Les

transcriptions sont effectuées sous les conditions standards (section 2.1.2), **1)** sans ajout de NMP; ou suite à l'addition de 4 mM d'échantillons de **2)** CMP; **4)** AMP; **6)** GMP et de **8)** UMP obtenus immédiatement après l'étape de séparation par IP-HPLC. D'autres transcriptions sont effectuées suite à l'addition de 4 mM d'échantillons de **3)** CMP; **5)** AMP; **7)** GMP et **9)** UMP obtenus suite à la purification de chacun des NMP par HPLC en phase inverse. Les bandes correspondant au gabarit d'ADN, ainsi qu'au produit principal de la transcription, l'ARN TL-let7g-ARiBo, sont identifiées. Adapté de (Dagenais and Legault 2012).

3.2. Exploration de la séquence d'attache nécessaire au clivage de l'étiquette ARiBo

Des études phylogénétiques et biochimiques antérieures ont permis de démontrer l'importance d'une adénine située à la position N-1 du site de clivage chez le ribozyme *glmS* (Barrick, Corbino et al. 2004; Roth, Nahvi et al. 2006). La mutation de cette adénine en guanine provoque une baisse de l'activité de clivage du ribozyme, sans toutefois l'inhiber complètement. Ce résultat laisse entrevoir la possibilité d'utiliser l'étiquette ARiBo (section 1.6.3) dans le but de purifier des ARN présentant différents nucléotides à leur extrémité 3'. Cette propriété est indispensable pour la purification d'ARN qui doivent se terminer par une séquence précise, comme le fragment accepteur servant à une ligation enzymatique.

3.2.1. Modifications de la séquence d'attache de l'étiquette ARiBo

L'étiquette ARiBo originale possède une séquence d'attache de deux nucléotides, GA, placée entre l'ARN d'intérêt et le site de clivage du ribozyme *glmS* (Di Tomasso, Lampron et al. 2011). Cette séquence permet un clivage efficace, en plaçant une adénine à la position N-1 du site de clivage, tout en s'assurant que ce site demeure simple brin. L'utilisation de séquences d'attache modifiées, présentant chacun des quatre nucléotides standard à la position N-1, permettrait de purifier une plus grande variété de séquences d'ARN par affinité. Afin d'explorer cette possibilité, différents riborégulateurs à adénine mutants U65C sont transcrits en tant qu'ARN de fusion comprenant l'étiquette ARiBo. Chacun de ces ARN présente une séquence d'attache différente (GA, GG, GC, GU ou simplement une adénine) et leur activité de clivage est évaluée directement à la suite de leur transcription (Figure 25).

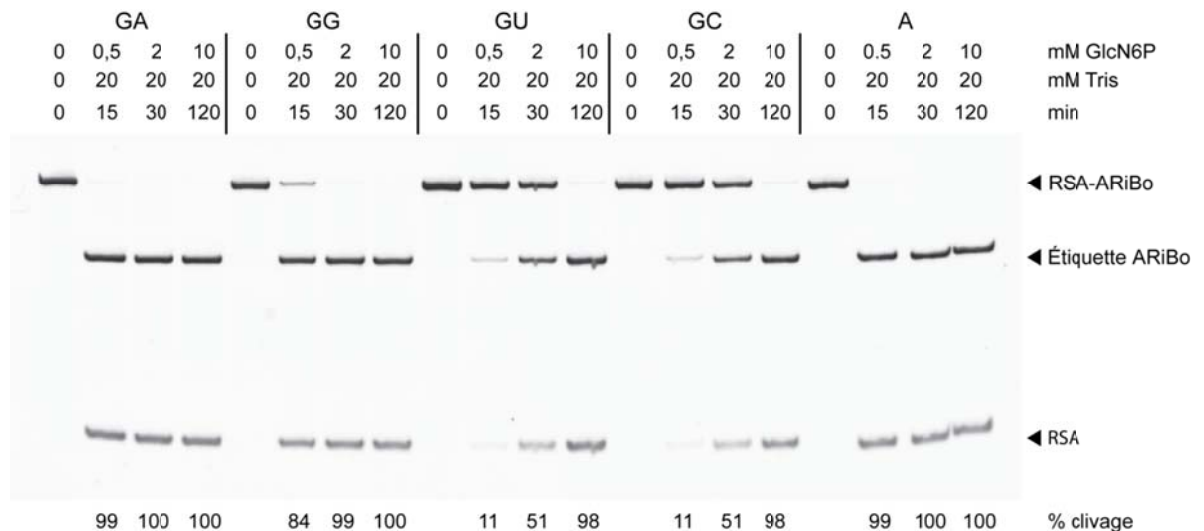


Figure 25 : Exigences de séquences d'attache au site de clivage de l'étiquette ARiBo.

Clivage de l'étiquette ARiBo effectué sur des riborégulateurs mutants U65C ayant différentes séquences d'attache (séquence GA originale, séquences GG, GU, GC et une

séquence d'attache comportant seulement une adénine). Le clivage est effectué à 37 °C en présence de 20 mM Tris et de 10 mM MgCl₂. La concentration de GlcN6P, ainsi que le temps d'incubation (min) sont indiqués au dessus des puits. Les réactions sont analysées sur un gel de polyacrylamide 10 % dénaturant et révélées à l'aide d'une coloration au *SYBR Gold*. Les bandes correspondant aux précurseurs RSA-ARiBo, ainsi qu'à l'étiquette ARiBo et au produit clivé (RSA) sont indiquées à la droite du gel. Le pourcentage de clivage est indiqué sous chacun des puits. Adapté de (Di Tomasso, Lampron et al. 2011).

Lorsque le clivage est effectué sous des conditions d'élution classiques (0,5 mM GlcN6P, 20 mM Tris pH 7,6 et 10 mM MgCl₂, 15 minutes à 37 °C), 99 % des molécules qui présentent des séquences d'attache GA et A sont clivées, tandis qu'un clivage moins efficace est observé pour les ARN comportant une séquence d'attache GG (84 %), GU (11 %) ou GC (11 %). Sous ces conditions, l'efficacité du clivage est donc classée selon l'ordre suivant : GA ~ A > GG > GC ~ GU, démontrant l'importance de l'adénine en position N-1 du ribozyme *glmS*. Le remplacement de ce résidu par une autre purine, la guanine, cause une légère diminution de l'activité de clivage, qui pourrait être expliquée par la formation d'une interaction moins efficace avec le résidu G57 du ribozyme et donc d'une liaison moins efficace du cofacteur GlcN6P. Il suffit d'effectuer une légère augmentation de la concentration de GlcN6P (2 mM) et du temps d'incubation à 37 °C (30 min) afin d'obtenir un clivage de 99 % lorsqu'une étiquette présentant une séquence d'attache GG est utilisée. Par contre, la présence d'une pyrimidine (C ou U), une base structurellement plus petite que les purines, diminue significativement le clivage du ribozyme *glmS*. Un clivage très efficace (98 %) est toutefois obtenu pour les séquences d'attache GC et GU en augmentant de façon plus significative la concentration de GlcN6P (10 mM) et le temps d'incubation (2 h) davantage. Ces conditions d'élution pourraient donc être utilisées afin de permettre la purification par affinité d'ARN présentant n'importe quel nucléotide standard à son extrémité 3'.

3.3. Jumelage de la synthèse enzymatique d'ARN, de la purification par étiquette ARiBo et de la ligation enzymatique

Le marquage isotopique segmentaire ou spécifique (section 1.3.4) d'ARN permet d'obtenir de l'information reliée à leur structure tridimensionnelle. Au cours des dernières années, l'élaboration de différentes stratégies de marquage isotopique a permis de résoudre plusieurs structures d'ARN complexes par spectroscopie RMN (Kinoshita, Nishigaki et al. 1997; Kim, Lukavsky et al. 2002; Kurata, Ohtsuki et al. 2003; Hobartner, Rieder et al. 2005; Nelissen, van Gammeren et al. 2008; Kawahara, Haruta et al. 2012). Cependant, toutes ces techniques sont extrêmement laborieuses et requièrent de grandes quantités de temps et d'argent afin de produire un seul échantillon d'ARN marqué sélectivement pouvant être étudié par spectroscopie RMN.

Le développement d'un nouveau protocole de séparation rapide de nucléotides marqués isotopiquement (section 3.1), ainsi que la possibilité de purifier des ARN présentant différents nucléotides à leur extrémité 3' en utilisant l'étiquette ARiBo (section 3.2) permettent maintenant d'élaborer une nouvelle stratégie de marquage spécifique des ARN. Cette stratégie sera utilisée afin de marquer spécifiquement le résidu G39 du riborégulateur à adénine mutant U65C (RSA) à l'aide de l'isotope ^{15}N , ce qui permettra de simplifier les spectres RMN et ainsi, d'attribuer sans ambiguïté ce résidu qui joue un rôle essentiel chez RSA.

3.3.1. Stratégie générale du marquage isotopique spécifique

La stratégie de marquage isotopique spécifique développée s'effectue en plusieurs étapes (Figure 26). Dans un premier temps, l'ARN d'intérêt, le RSA, est transcrit en deux fragments distincts (le RSA5' et le RSA3'), chacun comportant l'étiquette ARiBo à leur extrémité 3' respectives. Ces fragments sont conçus afin que le résidu G39, qui doit être marqué spécifiquement, soit le tout premier nucléotide à l'extrémité 5' du RSA3'. La transcription du RSA3' est effectuée à l'aide de nucléotides triphosphates non-marqués et de GMP¹⁵N, qui est incorporé uniquement au tout premier résidu à l'extrémité 5' de l'ARN seulement (section 1.5.2). Le RSA5' est quant à lui transcrit en présence de nucléotides non-marqués seulement. Ces fragments sont ensuite fixés sur une résine de GSH-sépharose via une protéine de fusion composée de la protéine GST et du peptide-N du bactériophage λ [section 1.6.3; (Di Tomasso, Lampron et al. 2011)]. Suite à plusieurs lavages, le RSA5' est clivé et purifié en présence de la GlcN6P, ce qui active l'auto-clivage du ribozyme *glmS* contenu dans l'étiquette ARiBo. Ce clivage crée une extrémité 2'-3'-phosphate-cyclique qui doit ensuite être transformée en extrémité 3'-hydroxyle grâce à un traitement à la T4 PNK afin d'être compatible avec la ligation enzymatique (Dekker, Abels et al. 2004). À ce moment, l'extrémité 5'-triphosphate obtenue lors de la transcription enzymatique doit aussi subir un traitement enzymatique, cette fois à l'aide de la phosphatase alcaline, afin d'être convertie en extrémité 5'-hydroxyle (Romaniuk, McLaughlin et al. 1982). À cette étape, le RSA5' purifié présente des extrémités adéquates pour servir de fragment accepteur et peut être ligué au RSA3' grâce à une réaction enzymatique. Afin de minimiser le nombre d'étapes de purification présentes dans cette stratégie de marquage isotopique spécifique, la ligation est effectuée alors que le RSA3'-ARiBo est toujours lié au support solide. Cette ligation est médiée par un ADN d'appariement et est effectuée à l'aide de la ligase à ADN ou de la ligase à ARN 1 du phage T4. Finalement, l'ADN d'appariement est éliminé et le produit ligué, le RSA marqué spécifiquement en ¹⁵N au résidu G39, est élué par clivage du ribozyme *glmS*.

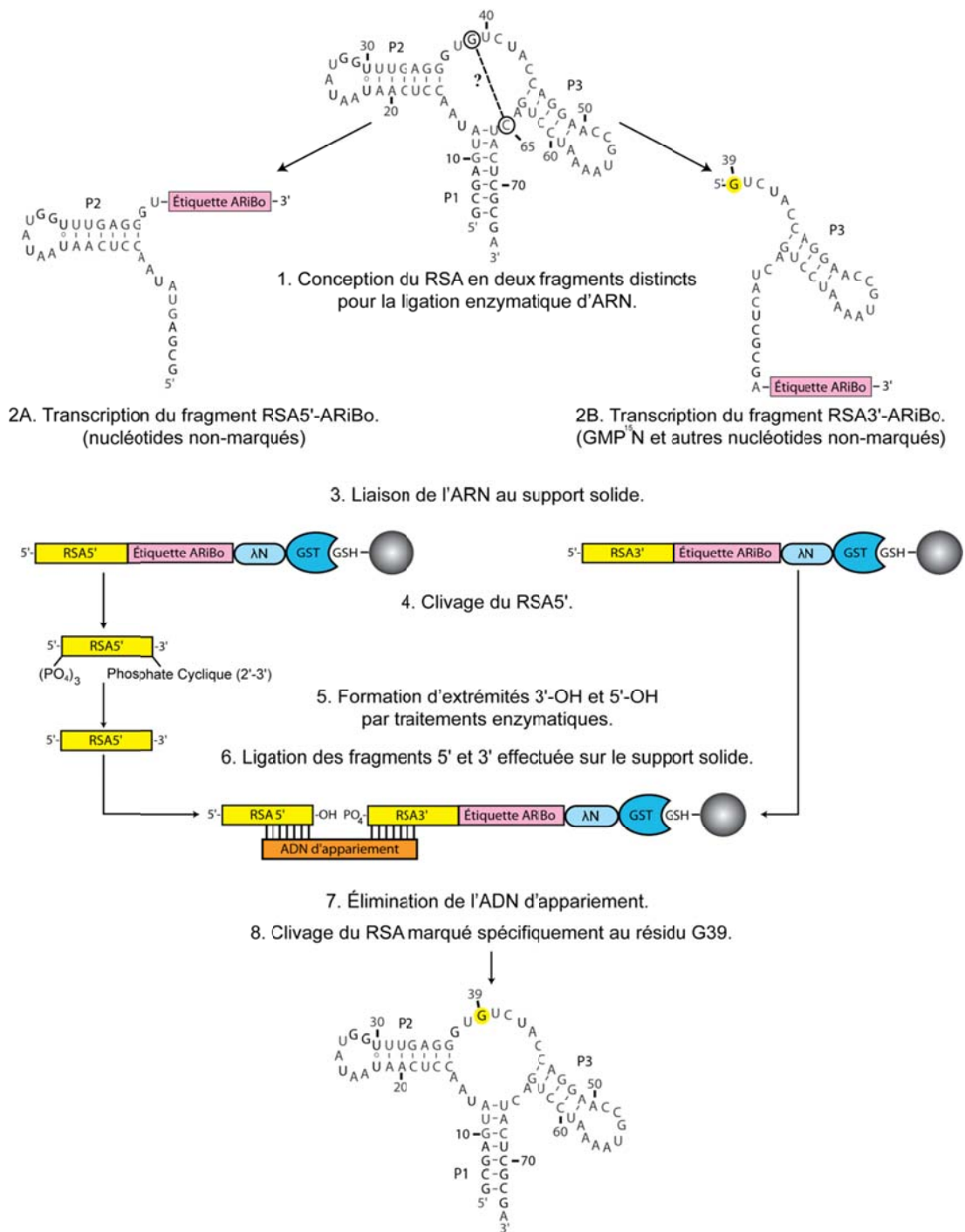


Figure 26 : Schéma global de la stratégie de marquage spécifique du RSA à l'aide de l'étiquette ARiBo.

Les fragments 5' et 3' (jaunes), l'étiquette ARiBo (rose), le peptide λ N (cyan), la protéine GST (bleu), le groupement GSH, la résine de sépharose (bille grise), ainsi que l'ADN d'appariement (orange) sont identifiés.

Afin de développer ce protocole de marquage spécifique des ARN, chacune des étapes de la Figure 26 a été optimisée dans le but de maximiser les rendements obtenus, tout en minimisant les coûts et le temps requis pour effectuer chacune de ces étapes.

3.3.2. Purification par affinité du fragment accepteur

La première étape de la méthode de marquage isotopique spécifique consiste à produire et à purifier un fragment accepteur par affinité en utilisant l'étiquette ARiBo. Un test de clivage, suivi d'une purification par affinité ont donc été effectués en utilisant le RSA5'-ARiBo, un fragment d'ARN comportant les 33 premiers nucléotides du riborégulateur à adénine mutant, fusionné à l'étiquette ARiBo.

Cette molécule sera utilisée dans le but d'effectuer un marquage isotopique spécifique du résidu G39 du RSA. Le RSA5' devra subséquemment être ligué enzymatiquement et possède donc une extrémité 3' stricte, finissant par un uracile. L'optimisation du clivage de cette molécule (Figure 27A) permet de déterminer une condition propice à son élution (> 95 % de clivage; incubation de 2 h à 37 °C en présence de 5 mM GlcN6P, 10 mM MgCl₂ et 40 mM Tris pH 7,6), ce qui démontre la possibilité de purifier le RSA5' par affinité en utilisant l'étiquette ARiBo.

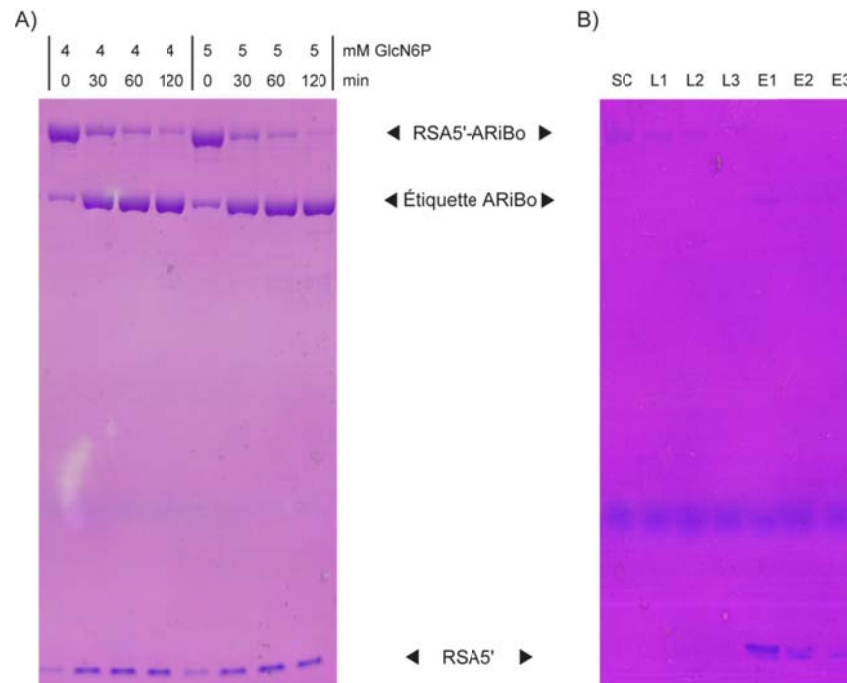


Figure 27: Clivage et purification du RSA5'-ARiBo.

A) L'optimisation du clivage du RSA5'-ARiBo est effectuée en variant la concentration de GlcN6P et le temps d'incubation à 37 °C en présence de 10 mM MgCl₂, ainsi que de 40 mM Tris pH 7,6. **B)** Une purification de l'ARN par affinité est effectuée en utilisant l'étiquette ARiBo et la condition d'élution optimale déterminée à partir de l'optimisation du clivage (2 h d'incubation à 37 °C en présence de 5 mM GlcN6P, 10 mM MgCl₂ et 40 mM Tris pH 7,6). Les réactions sont chargées sur des gels de polyacrylamide 10 % dénaturants, puis l'ARN est révélé en utilisant une solution de *Stains All*. Les puits correspondant au surnageant de chargement (SC), ainsi qu'aux trois étapes de lavage (L1, L2 et L3) ne présentent pas d'ARN. Les trois étapes d'élution (E1, E2 et E3) permettent de quantifier le RSA5' purifié.

Une purification à large échelle de 420 nmol de RSA5'-ARiBo est ensuite réalisée (Figure 27B). Cette manipulation permet d'obtenir 224 nmol d'ARN pur à plus de 90 %, ce qui représente un rendement de purification d'environ 53 % (0,25 mg d'ARN purifié par

mL de réaction de transcription). Ce résultat démontre qu'il est possible d'utiliser l'étiquette ARiBo afin de purifier plusieurs milligrammes d'ARN d'intérêt présentant un uracile à son extrémité 3'. De plus, le RSA5' purifié sera utilisé dans le but d'optimiser la deuxième étape du protocole de ligation sur support solide ARiBo, correspondant à la formation des extrémités hydroxyles nécessaires à la ligation enzymatique.

3.3.3. Formation d'extrémités hydroxyles

Suite à la purification par affinité, le RSA5' possède une extrémité 5'-triphosphate, formée lors de sa synthèse par la polymérase T7, ainsi qu'une extrémité 2'-3'-phosphate cyclique, créée par le clivage du ribozyme *glmS*. Afin d'effectuer une ligation enzymatique, ces deux extrémités doivent toutefois être converties en groupements hydroxyles (section 1.7.2). Ces groupements sont obtenues grâce à deux traitements successifs. Dans un premier temps, un traitement à la polynucléotide kinase (T4 PNK) est effectué. Cette enzyme possède une activité phosphatase qui permet la conversion d'un groupement 2'-3'-phosphate cyclique terminal en un groupement 3'-hydroxyle (Zhu, Smith et al. 2007). La complétion de la réaction est perçue par une migration légèrement plus lente de l'ARN déphosphorylé sur un gel de polyacrylamide dénaturant. Un traitement à la phosphatase alcaline est ensuite réalisé afin de convertir l'extrémité 5'-triphosphate du RSA5' en extrémité 5'-hydroxyle. La complétion de cette réaction est quant à elle très difficile à percevoir lorsque l'ARN est chargé sur un gel dénaturant, car la différence de migration est extrêmement légère. Une optimisation de chacune de ces réactions est effectuée afin d'obtenir du RSA5' présentant des extrémités 3' et 5'-hydroxyles (Figure 28).

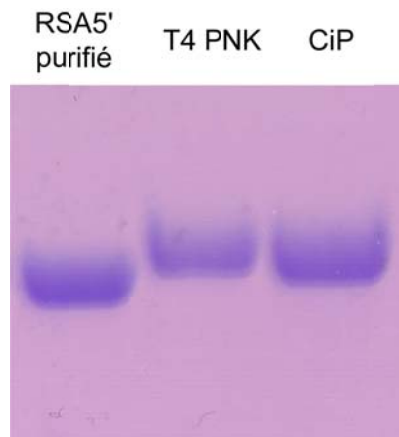


Figure 28 : Formation d'extrémités 3'-OH et 5'-OH par traitements enzymatiques.

Le RSA5' purifié par affinité de la Figure 27 est traité à la polynucléotide kinase du phage T4 (T4 PNK) et à la phosphatase alcaline (CiP) afin de créer respectivement, une extrémité 3'-hydroxyle et une extrémité 5'-hydroxyle. Chacune des réactions enzymatiques sont chargées sur un gel de polyacrylamide 20 % dénaturant et l'ARN est révélé à l'aide d'une solution de *Stains All*. Les puits correspondant au RSA5' purifié par affinité avant (RSA5' purifié) et après chacun des traitements enzymatiques (T4 PNK; CiP) sont identifiés.

3.3.4. Formation des complexes de pré-ligation

Suite à l'obtention d'extrémités 5'-hydroxyles, le RSA5' peut agir en tant que fragment accepteur lors d'une ligation enzymatique. Afin d'obtenir une ligation efficace, le RSA5' doit former un complexe de pré-ligation avec le RSA3' et un ADN d'appariement (section 1.7.2). Ce complexe permet de positionner les fragments d'ARN dans une conformation optimale pour la ligation. Les ligases à ADN et à ARN du phage T4 utilisent toutefois des complexes de pré-ligation présentant des structures différentes et doivent donc être optimisés séparément.

3.3.4.1. Complexe de pré-ligation servant à la ligase à ADN

Dans un premier temps, l'ADN d'appariement I (section 6.1) est conçu afin de permettre la formation de paires de bases Watson-Crick avec les 13 derniers résidus à l'extrémité 3' du fragment accepteur (RSA5'), ainsi qu'avec les 13 premiers nucléotides à l'extrémité 5' du fragment donneur (RSA3'). L'appariement entre cette molécule d'ADN, le RSA5' et le RSA3' forme alors un complexe de pré-ligation double brin, optimal pour une ligation catalysée par la ligase à ADN du phage T4 (section 1.7.2.1; Figure 15).

La formation du complexe de pré-ligation est effectuée en utilisant le RSA3' comme substrat limitant, car ce fragment est plus dispendieux à produire que les deux autres, puisqu'il contient le résidu G39 marqué spécifiquement en ^{15}N . Une optimisation de la durée et de la température des incubations permet de former le complexe ternaire. Le complexe de pré-ligation optimal est obtenu grâce à un processus de dénaturation et de renaturation lente comprenant un chauffage de 2 minutes à 65 °C, suivi d'une incubation de 10 minutes à 25 °C. De plus, cet appariement est optimal en présence d'un ratio molaire de

substrats de 1:1,4:1,75, correspondant respectivement au RSA3', au RSA5' et à l'ADN d'appariement I. La présence d'un excès de RSA5' et d'ADN d'appariement permet la formation d'un complexe de pré-ligation (Figure 29). Ce complexe peut ensuite être utilisé lors d'une réaction de ligation à l'aide de la ligase à ADN du phage T4.

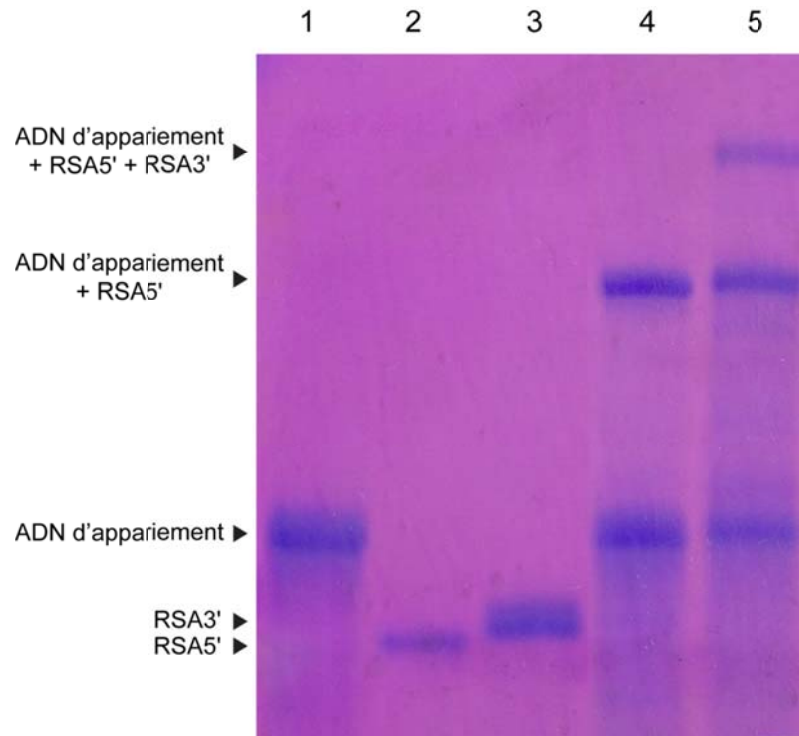


Figure 29 : Formation du complexe de pré-ligation entre le RSA3', le RSA5' et l'ADN d'appariement I.

Réaction d'appariement optimale entre le RSA3', le RSA5' et l'ADN d'appariement I. Un processus de dénaturation et de renaturation lente est effectué sur **1)** l'ADN d'appariement I seul; **2)** le RSA5' seul; **3)** le RSA3' seul; **4)** l'ADN d'appariement I en présence de RSA5' (substrat limitant), et **5)** l'ADN d'appariement I en présence de RSA5', ainsi que de RSA3' (substrat limitant). Le ratio molaire de substrats utilisé est de 1:1,4:1,75 (RSA3':RSA5':ADN d'appariement I). Les tests d'appariements sont chargés sur un gel

natif de polyacrylamide 8 % et la migration est effectuée à 250 V, durant 2 h à 4 °C. Les acides nucléiques sont révélés à l'aide d'une solution de *Stains All*.

3.3.4.2. Complexe de pré-ligation servant à la ligase à ARN 1

Un deuxième complexe de pré-ligation est formé, cette fois en utilisant l'ADN d'appariement II (section 6.1). Cette molécule d'ADN est conçue afin de former des paires de bases Watson-Crick avec respectivement 10 et 16 nucléotides de l'ARN accepteur (RSA5') et de l'ARN donneur (RSA3'), tout en laissant une région de 5 nucléotides non-appariés à l'extrémité 3' du RSA5'; ainsi qu'une région simple brin de 2 résidus à l'extrémité 5' du RSA3' [section 1.7.2.2.2; (Figure 17B)]. La liaison de l'ADN d'appariement, à la fois au RSA5' et au RSA3', crée donc un complexe de pré-ligation optimal pour l'utilisation de la ligase à ARN 1 du phage T4 (Persson, Willkomm et al. 2005).

La formation du complexe de pré-ligation est ensuite optimisée en utilisant le RSA3' comme substrat limitant. L'appariement optimal est obtenu suite à deux traitements consécutifs de dénaturation et de renaturation lente. Le premier est effectué en chauffant une solution comprenant l'ADN d'appariement II et le RSA5' pendant 2 minutes à 95 °C, suivi d'un refroidissement de 10 minutes à 25 °C. Le RSA3' est alors ajouté et un deuxième processus de dénaturation et de renaturation lente est réalisé, cette fois en effectuant une incubation de 2 minutes à 55 °C, suivie d'une incubation de 10 minutes à 25 °C. De plus, cet appariement est optimal en présence d'un ratio molaire de substrats de 1:1,5:1,75, correspondant respectivement au RSA3', au RSA5' et à l'ADN d'appariement II. L'utilisation d'un excès de RSA5' et d'ADN d'appariement II permet d'incorporer près de la totalité du RSA3' à l'intérieur du complexe de pré-ligation (Figure 30). Une ligation enzymatique à la ligase à ARN 1 du phage T4 peut ensuite être effectuée en utilisant le complexe de pré-ligation formé en tant que substrat.

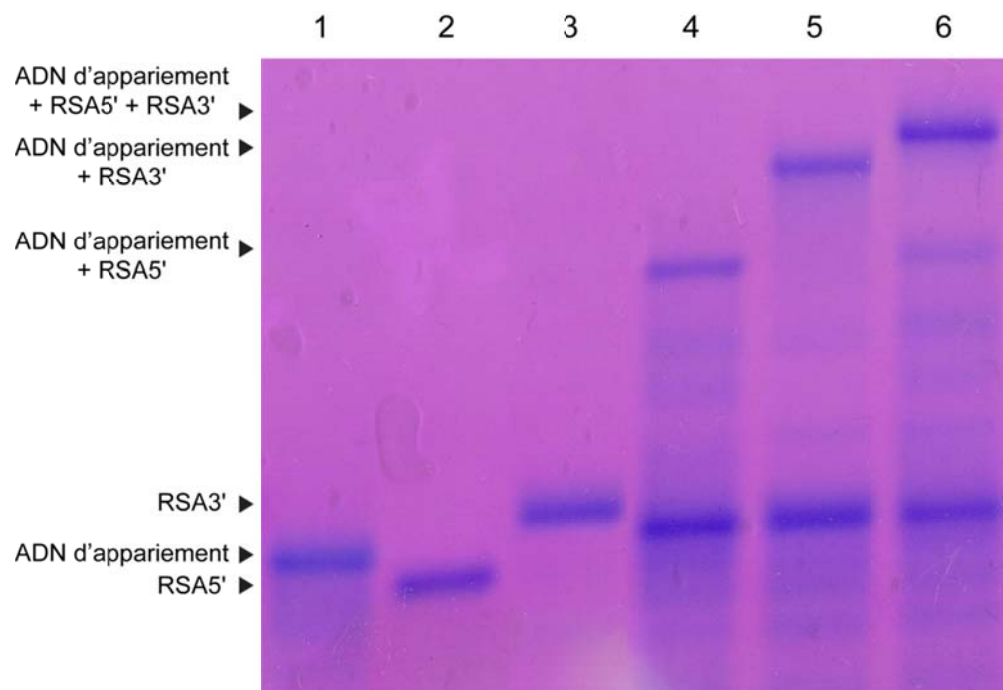


Figure 30 : Formation du complexe de pré-ligation entre le RSA3', le RSA5' et l'ADN d'appariement II.

Réactions d'appariement entre le RSA3', le RSA5' et l'ADN d'appariement II. Un processus de dénaturation et de renaturation lente a été effectué sur **1)** l'ADN d'appariement II seul; **2)** le RSA5' seul; **3)** le RSA3' seul; **4)** l'ADN d'appariement II en présence de RSA5' (substrat limitant); **5)** l'ADN d'appariement II en présence de RSA3' (substrat limitant), et **6)** l'ADN d'appariement II en présence de RSA5', suivi d'une deuxième étape de dénaturation et de renaturation lente, suite à l'ajout de RSA3' (substrat limitant). Le ratio molaire de substrats utilisé est de 1:1,5:1,75 (RSA3':RSA5':ADN d'appariement II). Les tests d'appariements sont chargés sur un gel natif de polyacrylamide 8 % et la migration est effectuée à 250 V, durant 2 h à 4 °C. Les acides nucléiques sont ensuite révélés à l'aide d'une solution de *Stains All*.

Optimisation de la ligation enzymatique du RSA

Une optimisation de la ligation enzymatique du RSA est effectuée en utilisant chacun des complexes de pré-ligation avec son enzyme respectif. Dans un premier temps, les réactions sont optimisées en solution afin de déterminer quelle enzyme procure le meilleur rendement de ligation. Ensuite, une ligation sur le support solide ARiBo est effectuée afin d'établir s'il est possible de jumeler la purification par affinité à la ligation enzymatique.

3.3.4.3. Ligations effectuées en solution

L'optimisation de la ligation du RSA à l'aide de la ligase à ADN du phage T4 (Figure 31) procure un rendement légèrement supérieur à 25 %, ce qui est respectable, car les rendements habituels pour ce type de ligation varient généralement entre 20 % et 50 % (Frilander and Turunen 2005). Ce rendement optimal est obtenu suite à une incubation de 24 h à 37 °C, en présence d'un tampon spécifique à la ligase à ADN T4 (section 2.4.4.1). Une diminution de la quantité de substrats (RSA3'; RSA5', ADN d'appariement I) est observée suite à une incubation plus longue (48 h). Ce traitement ne permet cependant pas d'augmenter la quantité de RSA formé. Afin de comprendre ce phénomène, un traitement identique est effectué sur un complexe de pré-ligation comprenant un ARN donneur qui possède une extrémité 5'-triphosphate non-compatible avec la ligation enzymatique. Cette diminution de substrats est toutefois toujours perçue après 48 h d'incubation. La diminution observée ne provient donc pas de l'incorporation de ces substrats au produit de ligation. Ces acides nucléiques subissent possiblement de la dégradation causée par une longue incubation à 37 °C en présence de MgCl₂.

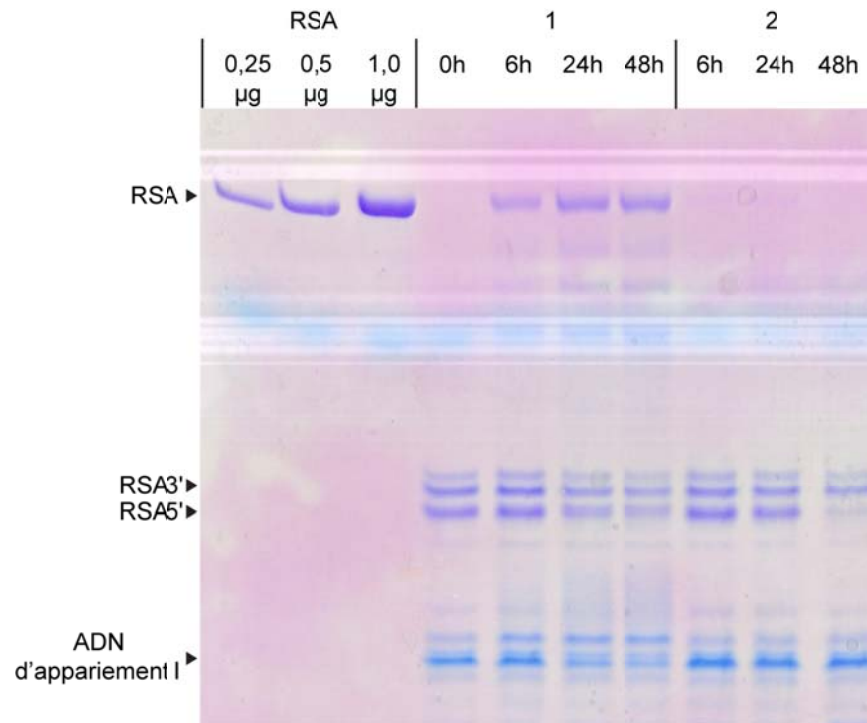


Figure 31 : Formation du RSA à l'aide de la ligase à ADN T4.

Optimisation de la ligation du RSA effectuée en utilisant le complexe de pré-ligation de la Figure 29 et la ligase à ADN du phage T4. Les tubes sont incubés à 37 °C durant 0 h, 6 h, 24 h et 48 h. Le RSA3' utilisé comporte des extrémités **1)** 3'-hydroxyle et 5'-monophosphate, permettant la ligation enzymatique et **2)** 3'-hydroxyle et 5'-triphosphate, inhibant la ligation enzymatique. Les réactions sont mises sur un gel de polyacrylamide 10 % dénaturant et les acides nucléiques sont révélés à l'aide d'une solution de *Stains All*. Le rendement de ligation obtenu est légèrement supérieur à 25 %.

Une deuxième optimisation de la ligation du RSA est ensuite effectuée, cette fois à l'aide de la ligase à ARN 1 du phage T4 (Figure 32). La réaction optimale est obtenue suite à une incubation de 4 h à 37 °C en présence d'un tampon spécifique à la ligase à ADN du phage T4 (section 2.4.4.2). Cette condition permet d'obtenir un rendement de ligation estimé entre 60 % et 75 %. La réaction est rapide et complétée en seulement quelques

heures d'incubation à 37 °C, ce qui permet de minimiser la dégradation des acides nucléiques utilisés.

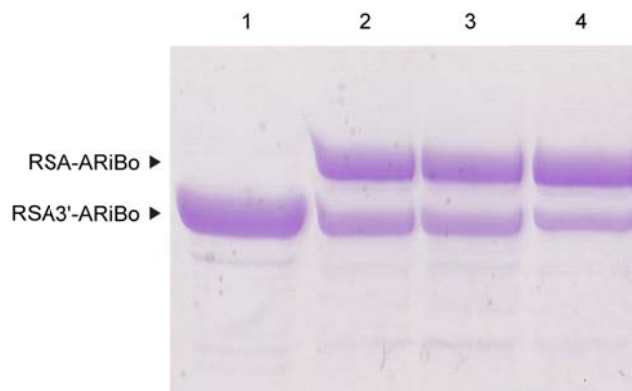


Figure 32 : Formation du RSA-ARiBo à l'aide de la ligase à ARN 1 T4.

Optimisation de la ligation du RSA effectuée en utilisant la ligase à ARN 1 du phage T4, ainsi qu'un complexe de pré-ligation formé du RSA3'-ARiBo, du RSA5' et de l'ADN d'appariement II. Les tubes sont incubés à 37 °C durant **1)** 0 h, **2)** 1 h **3)** 2 h et **4)** 4 h. Les réactions sont migrées sur un gel de polyacrylamide 10 % dénaturant et les acides nucléiques sont révélés à l'aide d'une solution de *Stains All*. Le rendement de ligation obtenu est estimé entre 60 % et 75 %.

La comparaison des rendements de ligation du RSA obtenus en utilisant la ligase à ADN ($\approx 25\%$) et la ligase à ARN 1 (60-75 %) du phage T4, permet de conclure sans hésitation que la ligase à ARN 1 est l'enzyme la plus efficace afin d'effectuer cette réaction. La ligase à ARN 1 est donc utilisée dans le but d'entreprendre une ligation du RSA sur le support solide ARiBo.

3.3.4.4. Ligation effectuée sur le support solide ARiBo

Une ligation du RSA sur support solide ARiBo est alors amorcée (Figure 33). Dans un premier temps, le RSA3'-ARiBo est fixé sur une résine de GSH-sépharose via une protéine de fusion N λ -GST. Trois lavages successifs sont ensuite effectués afin d'enlever les impuretés provenant de la transcription enzymatique du RSA3'-ARiBo. Le complexe de pré-ligation est alors formé tel qu'indiqué à la section 2.4.3.1. Une réaction de ligation à la ligase à ARN 1 du phage T4 est ensuite effectuée en utilisant la condition optimale trouvée à la section 3.3.4.3. Deux autres lavages sont réalisés, puis l'ARN d'intérêt est élué suite à l'introduction de la GlcN6P.

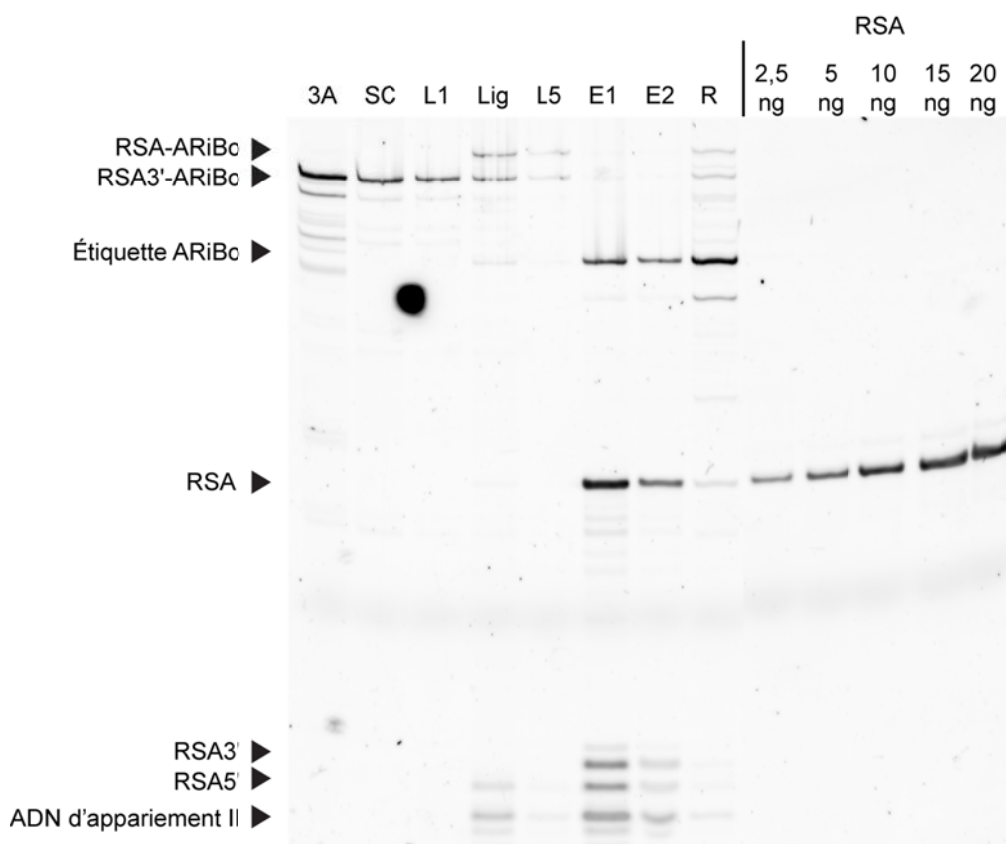


Figure 33 : Ligation sur support solide à l'aide de l'étiquette ARiBo.

Une réaction de ligation est effectuée alors que le RSA3'-ARiBo est fixé sur une résine GSH-sépharose. Les surnageants provenant de chacune des étapes de la purification par affinité et de la ligation enzymatique sont chargés sur un gel de polyacrylamide 10 %, puis les acides nucléiques sont révélés à l'aide d'une solution de *SYBR Gold*. Les puits correspondant à un contrôle de la transcription du RSA3'-ARiBo (3A), au surnageant de chargement (SC), aux étapes de lavage (L1 et L5), à l'étape de ligation (Lig), aux étapes d'élution (E1 et E2) et aux acides nucléiques toujours liés à la résine (R) sont identifiés en haut du gel. Plusieurs quantités de RSA préalablement purifié sont aussi chargées afin de quantifier le produit de ligation.

La bande correspondant au RSA présente dans chacune des fractions d'élution est quantifiée afin de déterminer la quantité de produit ligué élué. Le rendement final du produit ligué, purifié sur support solide ARiBo, est établi à 21 %. Ce pourcentage correspond à la quantité de RSA3'-ARiBo (substrat limitant) provenant de la transcription, qui est incorporé au RSA obtenu suite à la ligation et à la purification par affinité. Grâce à cette stratégie, il est possible d'obtenir 0,42 µg de RSA marqué spécifiquement pour 1 µL de transcription initiale du RSA3'-ARiBo (2 µg/µL). De plus, la ligation et la purification par affinité ARiBo sont effectuées en une seule journée de 8 heures de manipulations en laboratoire. Cependant, ce protocole ne permet toutefois pas d'obtenir un échantillon de RSA pur à plus de 90 %, nécessaire pour effectuer des études structurales par spectroscopie RMN. En effet, une quantité importante d'étiquette ARiBo clivée, de RSA3', de RSA5' et d'ADN d'appariement II contaminent l'échantillon de RSA suite aux étapes d'élution (Figure 33).

3.3.5. Transcription du RSA3'-ARiBo utilisant le GMP ¹⁵N obtenu par IP-HPLC

Afin d'utiliser la méthode de ligation sur résine ARiBo pour effectuer un marquage isotopique spécifique du RSA, le RSA3'-ARiBo doit être transcrit à l'aide de GMP¹⁵N produit à la section 3.1. L'utilisation d'un excès de GMP lors de l'initiation de la transcription à la polymérase T7 permet une incorporation spécifique de ce nucléotide au tout premier résidu à l'extrémité 5' de l'ARN synthétisé (Sampson and Uhlenbeck 1988).

Différentes réactions de transcription du RSA3'-ARiBo sont alors testées, chacune présentant un ratio molaire de GTP:GMP¹⁵N différent. Il est cependant impossible de déterminer le ratio de GTP:GMP¹⁵N optimal, permettant la meilleure incorporation du GMP¹⁵N à l'extrémité 5' du RSA3'-ARiBo en chargeant ces différentes réactions sur un gel de polyacrylamide 10 % dénaturant (Figure 34A). En effet, la différence de migration correspondant à l'incorporation du GMP¹⁵N au lieu du GTP, au cours de la transcription, est trop petite pour être perçue sur ce type de gel, car elle ne correspond qu'à deux groupements phosphate sur un ARN de 183 nucléotides.

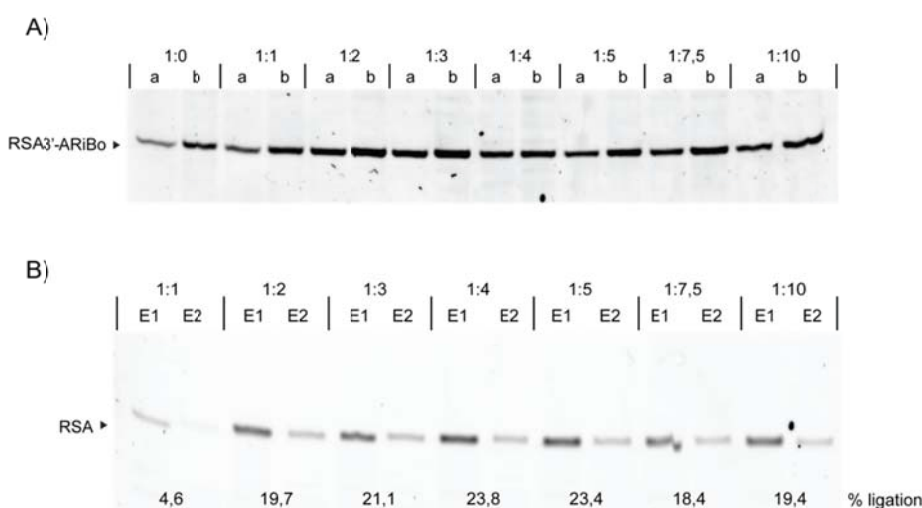


Figure 34 : Transcription du RSA3'-ARiBo à partir de différents ratios de GMP.

A) Réaction de transcription du RSA3'-ARiBo à l'aide de différents ratios de GTP:GMP¹⁵N. Pour chacune des conditions, 1 µL (a) et 2 µL (b) de la réaction sont chargés sur le gel. **B)** Comparaison des éluions provenant de la ligation sur support solide ARiBo de chacune des transcriptions illustrées en A). Le même volume d'éluion est chargé dans chacun des puits d'un gel de polyacrylamide 10 % dénaturant et l'ARN est révélé par un traitement au *SYBR Gold*. Les ratios molaires de GTP:GMP¹⁵N utilisés sont identifiés en haut du gel.

Chacune des transcriptions effectuées en présence de différents ratios de GTP:GMP¹⁵N de la Figure 34A sont utilisées comme ARN donneur lors d'une ligation sur support solide ARiBo (Figure 34B). Cette expérience permet de déterminer le ratio optimal de GTP:GMP¹⁵N à utiliser lors de la synthèse du RSA3'-ARiBo, car la ligation enzymatique à la ligase à ARN 1 du phage T4 requiert absolument la présence d'un groupement 5'-monophosphate sur l'ARN donneur (section 1.7.2.2). Ce groupement est présent chez l'ARN ayant incorporé le GMP¹⁵N lors de la transcription, mais absent des molécules dont la synthèse est initiée par le GTP. Un ratio de 1:4 (GTP:GMP¹⁵N) est donc utilisé pour la transcription enzymatique à large échelle du RSA3'-ARiBo, car ce ratio procure le meilleur rendement de ligation.

3.3.6. Matériel nécessaire au marquage sélectif d'ARN utilisant l'étiquette ARiBo

Suite à l'optimisation de chacune des étapes menant à la production de RSA marqué spécifiquement en ¹⁵N au résidu G39, une liste du matériel nécessaire au marquage sélectif est compilée (Tableau I). Cette liste est établie afin de permettre la production d'un échantillon de RMN de 350 µL de RSA à une concentration de 250 µM.

Matériel requis	Quantité requise	Prix (\$ CAN)
* RSA3'-ARiBo (transcription)	417 nmol	N/A
* GMP ¹⁵ N	101 µmol	N/A
* RSA5'-ARiBo (transcription)	1179 nmol	N/A
* RSA5'-ARiBo purifié par affinité	625 nmol	N/A
* Peptide-Nλ totale	235 mg	N/A
T4 polynucléotide kinase commerciale	1875 Unités	165
Phosphatase alcaline commerciale	125 Unités	15
Résine GSH-sépharose totale	74 mL	1335
ADN d'appariement II purifié	729 nmol	65
Ligase à ARN 1 T4 commerciale	16667 Unités	750

* Molécules produites en laboratoire; prix commercial non-applicable.

Tableau I : Compilation du matériel nécessaire au marquage sélectif du résidu G39 du RSA.

La quantité requise pour chacune des molécules est calculée en fonction des ratios optimaux et des rendements d'efficacité de chacune des étapes menant au marquage spécifique d'un échantillon de 350 µL de RSA à une concentration de 250 µM. Le prix associé au matériel devant être acquis commercialement est indiqué.

La production d'un échantillon de RMN de RSA marqué spécifiquement requiert une quantité importante (plusieurs milligrammes) de nombreuses molécules. Certaines d'entre-elles peuvent facilement être produites en laboratoire, par exemple le RSA3'-ARiBo et le RSA5' sont synthétisés enzymatiquement à l'aide d'une polymérase à ARN T7 purifiée en laboratoire (section 2.1.2), tandis que des protocoles détaillés, développés au laboratoire Legault, permettent la production de quantités préparatives du peptide-Nλ

[~ 250 mg de peptide-N λ à partir de 8 L de culture bactérienne; (Di Tomasso, Dagenais et al. 2012)] et de GMP¹⁵N [~ 340 μ moles de GMP¹⁵N à partir de 8 L de culture bactérienne; section 3.1; (Dagenais and Legault 2012)]. Certains produits, comme la résine GSH-sépharose et la ligase à ARN 1 du phage T4 doivent toutefois être obtenus commercialement, ce qui augmente considérablement les coûts associés à la production d'ARN marqué spécifiquement.

L'utilité de la technique de marquage isotopique spécifique des ARN développée dans ce mémoire est étroitement liée aux coûts associés à la production d'un échantillon de RMN, car cet aspect est primordial lors de l'élaboration de projets de recherche. Or, les prix élevés, associés à l'obtention de grandes quantités de résine GSH-sépharose et de ligase à ARN 1 du phage T4 présentés au Tableau I, limitent considérablement l'accessibilité de cette méthode de marquage spécifique d'ARN.

3.3.6.1. Production de ligase à ARN 1 du phage T4 en laboratoire

Afin de diminuer les coûts d'obtention de la ligase à ARN 1 du phage T4, cette enzyme est produite et purifiée en laboratoire en s'inspirant d'un protocole établi par le laboratoire Unrau [section 2.7; (Wang and Unrau 2002)]. Un test de ligation sur support solide ARiBo est ensuite effectué, afin de comparer l'efficacité de cette nouvelle enzyme maison, à celle de la ligase à ARN 1 du phage T4 obtenue commercialement (Figure 35). Suite à la quantification du produit de ligation, le RSA, les deux enzymes sont jugées équivalentes, car ils procurent des rendements finaux respectifs de 22 % et de 21 % pour la ligase commerciale et la ligase maison. Cette enzyme peut donc dorénavant être produite en laboratoire afin de minimiser les coûts liés au marquage spécifique d'ARN sur support solide ARiBo.

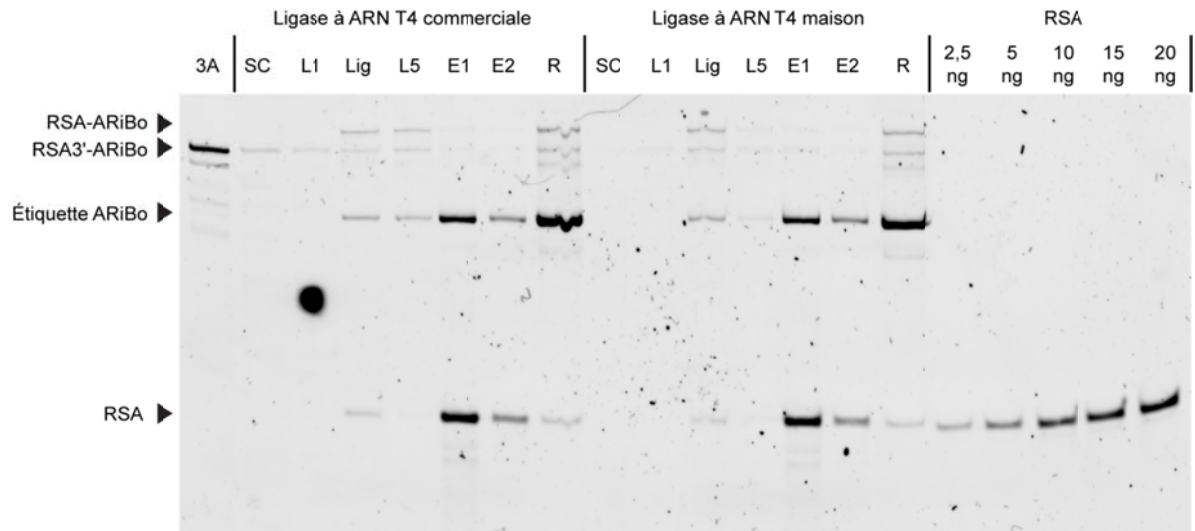


Figure 35 : Utilisation de la ligase à ARN 1 du phage T4 produite en laboratoire.

Comparaison des réactions de ligation du RSA effectuées sur le support solide ARiBo, en utilisant une ligase à ARN 1 du phage T4 commerciale et une ligase à ARN 1 du phage T4 maison. Les surnageants correspondant à chacune des étapes du protocole sont chargés sur un gel de polyacrylamide 10 %, puis les acides nucléiques sont révélés à l'aide d'un traitement au *SYBR Gold*. Les puits correspondant au contrôle de RSA3'-ARiBo (3A), au surnageant de chargement (SC), aux étapes de lavage (L1 et L5), à l'étape de ligation (Lig), aux étapes d'éluion (E1 et E2) et aux acides nucléiques toujours liés à la résine, élué suite à un traitement avec 2,5 M NaCl (R), sont identifiés en haut du gel. Plusieurs quantités de RSA préalablement purifié sont aussi chargées afin de quantifier le produit de ligation.

4. Discussion

4.1. Analyse du protocole de séparation des NMP par IP-HPLC

Suite au développement du protocole de séparation préparative des NMP par IP-HPLC, il est important d'évaluer son utilité en le comparant à d'autres méthodes permettant une séparation similaire. Les forces, les faiblesses, ainsi que les caractéristiques particulières de la technique doivent également être soulignées afin de déterminer la pertinence du protocole.

4.1.1. Comparaison avec les méthodes de séparation de NMP déjà existantes

Au fil des ans, plusieurs groupes de recherche ont développé des méthodes permettant la séparation préparative ou semi-préparative d'un mélange de NMP enrichis isotopiquement. Les méthodes publiées utilisent une colonne échangeuse d'anions ainsi que des solvants composés d'eau et de méthanol (Dieckmann, Suzuki et al. 1996), d'eau et d'éthanol acidifié (Nikonowicz, Sirr et al. 1992), de différentes concentrations d'acétate d'ammonium (Hines, Landry et al. 1994) ou d'un mélange de triéthylamine et d'acide acétique (Michnicka, Harper et al. 1993). Ces protocoles ont cependant été développés dans le but d'effectuer des études de RMN hétéronucléaire sur des molécules précises et sont décrits très brièvement dans la littérature, ce qui complique grandement la possibilité de les reproduire. De plus, il est impossible de déterminer si ces méthodes permettent la séparation des quatre NMP à haute résolution, car aucun chromatogramme de séparation n'est disponible dans la littérature.

Il n'existait jusqu'à maintenant, qu'un seul protocole détaillé permettant la séparation préparative de NMP à haute résolution. Cette séparation est effectuée par HPLC,

à l'aide d'une colonne échangeuse d'anions contenant une résine de polyéthylèneimine, et d'un gradient de formate d'ammonium permettant de diminuer graduellement le pH du solvant d'élution (Batey R.T., Battiste et al. 1995). Les solvants utilisés sont volatils et peuvent donc être éliminés par lyophilisation. Suite à leur séparation, les échantillons de NMP obtenus doivent toutefois être purifiés sur une colonne d'affinité de boronate afin qu'ils soient compatibles avec la synthèse enzymatique d'ARN. Cette purification nécessite plusieurs jours de travail en laboratoire pour chacun des NMP séparés, ce qui prolonge considérablement la durée des manipulations servant à la préparation des nucléotides.

Le nouveau protocole présenté à la Figure 22 (section 3.1.1.2) permet une séparation préparative efficace des NMP par IP-HPLC, à une résolution atteignant la ligne de base des chromatogrammes. Suite à une étape de purification par HPLC en phase inverse, les échantillons de NMP obtenus sont compatibles avec la synthèse enzymatique d'ARN. Cette purification est simple et rapide. Elle permet de retirer le TBA des échantillons et d'éliminer les traces d'impuretés qui absorbent à 260 nm et à 280 nm (Figure 23), et qui sont toujours présentes après la séparation des NMP. Cette purification ne nécessite aucun matériel additionnel que celui utilisé lors de la séparation du mélange de NMP (colonne de HPLC préparative de C₁₈, solvants composés d'eau et de méthanol) et permet la purification de chacun des NMP provenant d'un mélange de 1200 µmoles en une seule journée de 8 heures de travail. Le temps requis afin de séparer et de purifier les échantillons de NMP à l'aide de ce nouveau protocole de HPLC représente donc un avantage important par rapport au protocole détaillé déjà existant, qui nécessite une étape de purification sur une colonne d'affinité de boronate, nécessitant environ 2 jours de manipulation afin de purifier un seul des NMP obtenus.

4.1.2. Caractéristiques particulières du protocole de séparation des NMP

Les résultats présentés à la Figure 24 (section 3.1.3) démontrent qu'il est possible d'effectuer une réaction de transcription enzymatique en présence d'échantillons de NMP séparés, suite à leur purification par HPLC en phase inverse. Cependant, une analyse plus approfondie de cette figure permet de remarquer que l'échantillon de CMP¹⁵N obtenu immédiatement après la séparation par IP-HPLC n'inhibe aucunement la transcription de l'ARN d'intérêt. Ce phénomène pourrait être expliqué en se basant sur la charge globale adoptée par chacun des NMP lors de leur séparation. En effet, selon une étude antérieure, le CMP est le seul NMP du mélange à posséder une charge nette positive à pH 2,3 (Cohn 1950). Contrairement aux autres NMP, le CMP ne formerait donc pas d'interaction ionique avec le TBA, chargé positivement, et n'interagirait pas avec la colonne de C₁₈. Ceci expliquerait pourquoi le CMP est élué immédiatement après le volume mort suite à l'injection du mélange de NMP sur la colonne de HPLC. De plus, il est possible que l'absence d'interaction entre le CMP et le TBA favorise l'évaporation de ce dernier, lorsque l'échantillon est concentré à l'aide d'un évaporateur rotatif. Ceci expliquerait donc la formation de l'ARN d'intérêt lors de la transcription enzymatique en présence du CMP¹⁵N provenant directement de la séparation par IP-HPLC, tandis qu'elle est inhibée en présence de chacun des trois autres NMP.

Il est important de noter que même si l'échantillon de CMP¹⁵N provenant de la séparation par IP-HPLC est compatible avec la synthèse enzymatique d'ARN, l'étape de purification par HPLC en phase inverse devrait tout de même être effectuée afin de s'assurer que l'échantillon obtenu soit de haute qualité. De plus, des quatre NMP obtenus, seul le GMP peut être incorporé directement lors d'une réaction de transcription enzymatique, et seulement comme tout premier résidu à l'extrémité 5' de l'ARN produit. Les autres NMP purifiés n'inhibent pas la transcription, mais ne sont aucunement

incorporés dans l'ARN au cours de celle-ci. Ces échantillons peuvent ensuite être transformés en NTP à l'aide d'un protocole déjà établi (Simon, Grabowski et al. 1990) afin d'être incorporés dans l'ARN synthétisé.

La stratégie de séparation des NMP par IP-HPLC, présentée dans ce mémoire, permet de produire des échantillons servant au marquage isotopique spécifique d'un seul résidu à l'intérieur d'un ARN autrement non-marqué, tel que le résidu G39 du RSA. Toutefois, les NMP séparés peuvent aussi être utilisés afin de préparer différents types d'échantillons de RMN. Par exemple, des molécules d'ARN complexes, marquées sélectivement en un seul ou en plusieurs types de nucléotide (ATP, GTP, CTP et/ou UTP) peuvent être synthétisées suite à la phosphorylation des NMP en NTP. Ces échantillons permettent de faciliter l'attribution de résidus précis en simplifiant considérablement les spectres de RMN obtenus (Nikonowicz, Sirtt et al. 1992; Batey R.T., Battiste et al. 1995). Certaines études de RMN effectuées sur des molécules spécifiques peuvent également bénéficier de la nouvelle technique de séparation des NMP. Par exemple, l'AMP marqué isotopiquement en ^{13}C et en ^{15}N peut être utilisé comme ligand afin d'obtenir de l'information structurale sur un complexe formé avec un aptamère liant l'ATP (Dieckmann, Suzuki et al. 1996).

Le protocole de HPLC développé permet donc la séparation préparative d'un mélange de NMP marqué isotopiquement ($\sim 1200 \mu\text{moles}$) et de purifier chacun des échantillons obtenus afin qu'ils soient compatibles avec une réaction de transcription enzymatique. La séparation est rapide, efficace et permet la synthèse d'ARN sujets à divers types d'études structurales.

4.2. Analyse de la séquence d'attache nécessaire au clivage de l'étiquette ARiBo

Une étude visant à explorer la capacité du ribozyme *glmS* à cliver des substrats qui présentent différents nucléotides à leur position N-1 a été effectuée. Cette étude permet d'explorer la possibilité d'utiliser l'étiquette ARiBo afin de purifier des molécules d'ARN qui comportent différents résidus à leur extrémité 3'. Le clivage d'une molécule de RSA-ARiBo comportant une séquence d'attache GA ou une séquence d'attache composée d'une seule adénine a donc été effectué. L'utilisation de conditions d'élution classiques (0,5 mM GlcN6P; 20 mM Tris pH 7,6; 10 mM MgCl₂; incubation de 15 min à 37°C) procure un rendement de clivage supérieur à 99 % (Di Tomasso, Lampron et al. 2011). Cependant, l'utilisation de conditions d'élution plus rigoureuses (jusqu'à 10 mM GlcN6P et incubation de 2 h) est nécessaire afin d'atteindre un clivage similaire pour des ARN présentant d'autres nucléotides à leur position N-1 (Figure 25). Aucune dégradation de l'ARN clivé n'est perçue suite à ces nouvelles incubations, et elles peuvent être utilisées afin de purifier virtuellement n'importe quelle molécule d'ARN.

4.2.1. Restrictions du clivage de l'étiquette ARiBo

Il faut toutefois porter une attention particulière à la conformation du résidu N-1 lors de la conception d'un ARN destiné à être purifié par la méthode ARiBo, car ce résidu doit être simple brin afin de permettre le clivage du ribozyme *glmS* (Klein, Wilkinson et al. 2007). De plus, la formation de paires de bases entre l'ARN d'intérêt et le ribozyme *glmS* présent dans l'étiquette ARiBo risque de modifier la structure tridimensionnelle du ribozyme et peut provoquer une baisse significative de l'activité de clivage du ribozyme. Ce phénomène est rarement observé lorsque des ARN fonctionnels (riborégulateurs, miARN, ribozymes, etc.) sont transcrits en amont de l'étiquette ARiBo, car ces molécules adoptent généralement une structure tridimensionnelle stable. La purification de fragments

d'ARN utilisés pour la ligation enzymatique est toutefois plus problématique, car ces ARN, généralement non-structurés, peuvent former des interactions avec certaines régions de l'étiquette ARiBo. Dans ce cas, la purification par affinité ARiBo peut toujours être effectuée, mais procurera des rendements plus faibles.

4.2.2. Éluion rigoureuse et purification par affinité

L'augmentation de la concentration de glucosamine-6-phosphate et du temps d'incubation à 37°C permet de cliver efficacement des ARN présentant n'importe quel résidu autre que l'adénine optimale, à leur position N-1. L'utilisation de ces conditions d'éluion rigoureuses semble toutefois réduire le degré de pureté de l'ARN obtenu suite à une purification par affinité ARiBo (Figure 27B). En effet, cette nouvelle incubation introduit une petite proportion d'étiquette ARiBo comme contaminant lors des étapes d'éluion. Cette étiquette clivée peut cependant être éliminée suite à une étape de lavage simple, qui consiste en une incubation de l'échantillon d'ARN en présence d'un excès de résine GSH-sépharose et d'une petite quantité de protéine de fusion Nλ-GST. Suite à ce lavage, l'ARN d'intérêt récupéré présente un degré de pureté similaire à celui d'une purification par affinité ARiBo effectuée sous des conditions de clivage classiques. Cette étape de purification additionnelle n'est cependant pas jugée nécessaire pour la purification du RSA5' (Figure 27B), car l'étiquette ARiBo présente dans l'éluion est éliminée de l'échantillon suite à l'étape de ligation sur support solide ARiBo effectuée pour le marquage spécifique du RSA.

Les conditions d'éluion plus rigoureuses déterminées dans ce mémoire ont été optimisées pour la purification de constructions de RSA présentant différentes séquences d'attache. Or, ces mêmes conditions d'éluion peuvent être utilisées pour la purification de diverses molécules d'ARN par affinité, en utilisant la méthode ARiBo, sans restriction de séquence. Ceci est un avantage important, car la purification par affinité ARiBo peut

désormais être utilisée comme méthode alternative à la purification classique par électrophorèse sur gels de polyacrylamide dénaturants, et ce pour tout ARN d'intérêt.

4.3. Analyse du marquage isotopique spécifique des ARN sur support ARiBo

Suite à l'élaboration de la méthode de marquage isotopique spécifique des ARN sur support solide ARiBo, chacune des étapes de la stratégie doit être analysée afin de souligner leurs forces et leurs faiblesses. Les améliorations pouvant être apportées au protocole sont discutées et une comparaison aux stratégies de marquage spécifique d'ARN déjà existantes est effectuée dans le but d'évaluer l'utilité de la méthode développée.

4.3.1. Incorporation du GMP¹⁵N

Des études antérieures démontrent la capacité de la polymérase T7 à initier la transcription enzymatique à l'aide du GMP (Pitulle, Kleineidam et al. 1992). Ce nucléoside ne possède cependant pas de groupement 5'-triphosphate, nécessaire à l'élongation de la transcription. Le GMP ne peut donc être incorporé qu'au tout premier résidu à l'extrémité 5' d'un ARN transcrit enzymatiquement. Suite à la comparaison des éluions de ligations enzymatiques effectuées à l'aide de différents ratios de GTP:GMP (Figure 34), le ratio permettant une production optimale de RSA est évalué à 1:4. L'utilisation de ce ratio permet d'introduire le GMP chez environ 90 à 95 % des ARN transcrits (Sampson and Uhlenbeck 1988). Ceci signifie que 5 à 10 % de l'ARN transcrit comporte un GTP à son extrémité 5', le rendant inactif pour la ligation enzymatique. Suite à une transcription du fragment donneur à l'aide d'un excès de GMP¹⁵N, la totalité de l'ARN ligué possède donc un résidu marqué isotopiquement à la position G39. De plus, il est important de noter que le ratio de GTP:GMP peut être diminué afin d'accroître la probabilité d'introduction du GMP

chez l'ARN. Cependant, cette condition réduit légèrement les rendements de transcription obtenus, ce qui diminue aussi la quantité de produit de ligation formé.

L'utilisation d'une concentration quatre fois plus élevée de GMP^{15}N , par rapport à celle du GTP présente lors de la transcription peut sembler très dispendieuse, surtout si le GMP^{15}N utilisé est obtenu commercialement. Cependant, le protocole de séparation des NMP procure 340 μmoles de GMP^{15}N purifiés (valeur commerciale d'environ 3 200 \$) pour une préparation de 1200 μmoles d'un mélange de NMP total, ce qui permet de transcrire plus de 1400 nmol de fragment donneur marqué à son extrémité 5', comme le RSA3'-ARiBo. Cette quantité est amplement suffisante pour permettre la production d'un échantillon de RMN marqué spécifiquement. De plus, afin de limiter les pertes de nucléoside marqué, il serait possible d'établir un protocole de récupération du GMP^{15}N , appliqué lors du marquage spécifique sur support ARiBo. En effet, lors de la première étape de la ligation sur support solide, le fragment donneur est fixé à la résine GSH-sépharose via la protéine $\text{N}\lambda\text{-GST}$ et l'étiquette ARiBo. Or, l'excès de GMP^{15}N non-incorporé lors de la transcription n'interagit pas avec la résine et se retrouve donc dans le surnageant de chargement, tout comme les ARN contaminants et tout autre composé présent lors de la transcription enzymatique. Afin de récupérer l'excès de GMP^{15}N , il suffirait donc de modifier le protocole de séparation des NMP par IP-HPLC dans le but de purifier le GMP^{15}N des autres constituants de la réaction de transcription. Cette étape supplémentaire permettrait alors d'améliorer la stratégie de marquage isotopique spécifique existante, en diminuant la quantité de GMP^{15}N utilisée pour chaque marquage.

4.3.2. Formation du complexe de pré-ligation

4.3.2.1. Formation d'extrémités compatibles avec la ligation

La formation d'une extrémité 3'-hydroxyle chez le fragment accepteur est essentielle à l'obtention d'ARN ligué enzymatiquement. De plus, la présence d'une extrémité 5'-hydroxyle sur ce fragment empêche la formation de sous-produits de ligation [section 1.7.2.2; (Persson, Willkomm et al. 2005)]. La stratégie de ligation sur support ARiBo exposée dans ce mémoire emploie des traitements successifs à la polynucléotide kinase du phage T4 (T4 PNK) et à la phosphatase alcaline afin d'obtenir ces extrémités. Or, l'ordre dans lequel ces traitements sont effectués est très important, car la T4 PNK possède une activité multiple (Zhu, Smith et al. 2007). Cette enzyme est utilisée afin de transformer l'extrémité 2'-3'-cyclique phosphate du fragment accepteur en une extrémité 3'-hydroxyle. Cette réaction est plus efficace en présence d'ATP (résultats non-montrés), mais peut cependant aussi catalyser l'ajout d'un groupement phosphate à l'extrémité 5' d'un ARN possédant une extrémité 5'-OH (Novogrodsky, Tal et al. 1966). Afin d'éviter d'obtenir un fragment accepteur possédant une extrémité 5'-monophosphate, la réaction de T4 PNK et l'inactivation de cet enzyme par chauffage sont effectués avant le traitement à la phosphatase alcaline, qui permet d'obtenir une extrémité 5'-hydroxyle.

Ces deux traitements enzymatiques nécessitent des incubations de plusieurs heures à 37°C en présence de MgCl₂. De plus, l'inactivation des enzymes requiert de courts chauffages à des températures élevées. Ces conditions favorisent généralement la dégradation de molécules d'ARN, surtout lorsque celles-ci sont peu structurées. Des inhibiteurs de RNase sont donc utilisés lors des traitements à la T4 PNK et à la phosphatase alcaline, afin de limiter cette dégradation et d'obtenir des échantillons pouvant servir à la ligation enzymatique.

Plusieurs méthodes différentes peuvent aussi être utilisées afin d'obtenir des extrémités compatibles avec la ligation enzymatique. Par exemple, l'extrémité 5'-hydroxyle du fragment accepteur peut être générée immédiatement après la transcription suite au clivage d'un ribozyme placé en amont de la séquence d'intérêt [section 1.5.2; (Mörl, Lizano et al. 2005)]. L'utilisation du ribozyme Hammerhead permettrait possiblement d'améliorer la stratégie développée, en éliminant le traitement à la phosphatase alcaline. De plus, une transcription enzymatique effectuée sans utiliser de ribozyme auto-clivable à l'extrémité 3' de l'ARN permettrait de former un groupement 3'-hydroxyle chez le fragment accepteur. Cet ARN devra toutefois être purifié sur gels d'électrophorèse dénaturants (section 1.6) afin de séparer le produit principal de transcription des produits contenant un nucléotide de plus ou de moins. Ceci peut être problématique pour des ARN de grande taille (> 30-35 nt). Pour cette raison, l'utilisation d'un ribozyme auto-clivable comme le *glmS*, contenu dans l'étiquette ARiBo, est préférable et assure une homogénéité à l'extrémité 3' du fragment accepteur.

Quant à l'ARN donneur, un traitement à la phosphatase alcaline, suivi d'une réaction à la T4 PNK en présence d'ATP permet d'obtenir une extrémité 5'-monophosphate. Cette stratégie ne permet cependant pas de marquer le résidu situé à l'extrémité 5' de l'ARN à l'aide d'isotopes stables. L'initiation de la transcription en présence d'un excès de GMP^{15}N est donc utilisée dans ce mémoire, car cette méthode est plus simple et permet le marquage d'un résidu spécifique à l'extrémité 5' de l'ARN produit. L'extrémité 3' du fragment donneur, quant à elle, semble être protégée contre une ligation non-désirée grâce à la structure compacte de l'étiquette ARiBo. De plus, l'utilisation d'un ADN d'appariement lors de la ligation enzymatique permet de favoriser la ligation désirée.

4.3.2.2. Formation de complexes ternaires

La formation efficace d'un complexe entre un ARN accepteur, un ADN d'appariement et un ARN donneur dicte généralement le rendement de ligation enzymatique obtenu (Stark, Pleiss et al. 2006). Ce complexe permet de rapprocher les extrémités réactives des fragments à liguer, ce qui favorise grandement la formation du produit désiré par rapport à celle de sous-produits (Persson, Willkomm et al. 2005). Le complexe de pré-ligation utilisé pour la ligation du RSA-ARiBo est formé à la suite de deux réactions successives de dénaturation et de renaturation lente (section 3.3.4.2) effectuées à différentes températures. La deuxième réaction permet d'hybrider le RSA3'-ARiBo, préalablement fixé au support solide, à l'ADN d'appariement II et au RSA5'. La présence de protéines restreint toutefois la température à laquelle cette réaction d'hybridation peut être effectuée, car une incubation à plus de 65°C risque de dénaturer les protéines impliquées dans l'interaction entre l'étiquette ARiBo et le support solide, ce qui empêcherait la purification par affinité. Ceci limite donc l'application de la technique, car certains ARN plus structurés, qui requièrent une température élevée afin de former des paires de base avec un ADN d'appariement, ne pourront pas être utilisés. Ces ARN peuvent toutefois être ligués sans support solide ARiBo, puis purifiés par affinité par la suite.

4.3.3. Amélioration de la pureté de l'échantillon ligué

L'échantillon de RSA obtenu par ligation sur support solide ARiBo (Figure 33) présente un degré de pureté inférieur à 90 %, ce qui est insuffisant pour effectuer des études structurales de spectroscopie RMN. Cet échantillon comporte plusieurs contaminants connus, tel que l'étiquette ARiBo, le RSA5', l'ADN d'appariement II, ainsi que le RSA3'. Plusieurs stratégies différentes pourraient être utilisées afin d'éliminer chacun de ces contaminants et d'améliorer la pureté de l'échantillon de RSA obtenu.

Dans un premier temps, l'étiquette ARiBo peut être éliminée de l'échantillon en effectuant une incubation en présence de résine GSH-sépharose, préalablement liée à la protéine N λ -GST. Cette étape de lavage additionnelle permet de fixer l'étiquette ARiBo au support solide via l'interaction *Boxb*-N λ . Le RSA, qui ne peut former cette interaction spécifique, demeure alors en solution et peut facilement être récupéré. Cette étape permet donc d'obtenir un échantillon de RSA ligué, exempt d'étiquette ARiBo. L'incubation du RSA en présence de résine GSH-sépharose présente toutefois un désavantage important. En effet, l'ARN d'intérêt semble interagir de manière non-spécifique avec le support solide, ce qui cause une perte considérable du produit de ligation final. L'utilisation d'une quantité équivalente à 5 % de la quantité initiale de résine GSH-sépharose permet de retirer complètement l'étiquette ARiBo du produit de ligation. Cette manipulation additionnelle provoque toutefois des pertes d'environ 25 % du produit de ligation final (résultats non-montrés).

Le RSA5' et l'ADN d'appariement II semblent aussi former des interactions non-spécifiques lors de la ligation sur support solide ARiBo (Figure 33). Ces acides nucléiques sont ajoutés en excès lors de l'étape de ligation et demeurent dans l'échantillon suite aux lavages précédents l'élution. Le RSA5' et l'ADN d'appariement II sont ensuite élués en présence du tampon d'élution (0,5 mM GlcN6P; 10 mM MgCl₂; 20 mM Tris) et contaminent donc l'échantillon de RSA final. Afin de résoudre ce problème, une faible concentration de NaCl (100 à 500 mM) pourrait être ajoutée au tampon de lavage utilisé entre la ligation enzymatique et l'élution. Cet ajout permettrait alors de rompre certaines interactions non-spécifiques formées entre le RSA5', l'ADN d'appariement II et le support solide et ainsi d'éliminer l'excès d'acides nucléiques avant l'étape d'élution. Par contre, l'introduction d'une concentration trop élevée de NaCl (> 500 mM) pourrait toutefois s'avérer problématique, car elle provoquerait le détachement du RSA-ARiBo du support solide, causant ainsi une perte significative du produit de ligation.

L'ADN d'appariement pourrait aussi être éliminé en insérant une étape de traitement à la DNase I après la ligation enzymatique, mais avant l'élution du produit ligué. Ce traitement permettrait alors de dégrader spécifiquement l'ADN d'appariement (Kurschat, Muller et al. 2005), qui sera éliminé de l'échantillon grâce aux étapes de lavage subséquentes.

Les réactions de ligation enzymatique procurent généralement des rendements entre 20 et 80 % de ligation (Frilander and Turunen 2005; Stark, Pleiss et al. 2006), ce qui signifie qu'une fraction importante d'ARN donneurs non-ligués (RSA3'-ARiBo), susceptibles au clivage de l'étiquette ARiBo, est toujours présente suite à l'étape de ligation sur support solide. Il est alors impossible de séparer l'ARN donneur du produit de ligation (RSA-ARiBo) avant d'effectuer leur élution, car ces ARN sont fixés au support solide à l'aide d'une étiquette identique. L'ajout d'une étiquette d'affinité différente, placée à l'extrémité 5' de l'ARN accepteur (RSA5') permettrait cependant de résoudre ce problème, car le produit de ligation final, qui comporterait cette nouvelle étiquette, pourrait alors être purifié.

Les étapes additionnelles suggérées ici pourraient permettre d'améliorer la stratégie de ligation enzymatique sur support solide ARiBo en éliminant certains contaminants précis de l'échantillon final. Cependant, ces modifications complexifient grandement la stratégie et nécessitent une optimisation rigoureuse afin de perfectionner chacune d'entre elles. Il est donc plus simple d'effectuer une étape de purification supplémentaire par électrophorèse sur gels dénaturants ou par chromatographie liquide (sections 1.6.1 & 1.6.2) suite à l'élution du produit ligué. Cette dernière purification permet alors d'éliminer tous les contaminants présents dans l'échantillon de RSA en une seule étape.

4.3.4. Réduction des coûts du marquage spécifique sur support ARiBo

L'ajout d'une étape de purification additionnelle à la fin du protocole engendre cependant des pertes significatives du produit final. Ces pertes sont généralement estimées entre 25 % et 40 %, selon la méthode de purification utilisée. L'obtention d'un échantillon pur pouvant être étudié par spectroscopie RMN nécessite donc une production accrue du produit de ligation afin de compenser pour les pertes engendrées par cette étape de purification. La quantité de matériel requis, ainsi que les coûts de production d'un échantillon marqué spécifiquement en ^{15}N augmentent donc aussi d'environ 40 % (Tableau II).

Matériel requis	Quantité requise	Prix (\$ CAN)
* RSA3'-ARiBo (transcription)	583 nmol	N/A
* GMP ^{15}N	141 μmol	N/A
* RSA5'-ARiBo (transcription)	1651 nmol	N/A
* RSA5'-ARiBo purifié par affinité	875 nmol	N/A
* Peptide-N λ totale	329 mg	N/A
T4 polynucléotide kinase commerciale	2625 Unités	231
Phosphatase alcaline commerciale	175 Unités	21
Résine GSH-sépharose totale	104 mL	1869
ADN d'appariement II purifié	1021 nmol	91
Ligase à ARN 1 T4 commerciale	23333 Unités	1050

* Molécules produites en laboratoire; prix commercial non-applicable.

Tableau II : Matériel nécessaire au marquage sélectif d'un échantillon présentant un haut niveau de pureté.

Les quantités établies au Tableau I sont ajustées afin de prendre en compte l'étape de purification additionnelle (pertes de 40 %) requise pour l'obtention d'un échantillon de RMN présentant un haut niveau de pureté. Le prix associé au matériel devant être acquis commercialement est indiqué.

Les coûts élevés illustrés au Tableau II représentent un obstacle majeur à l'accessibilité de la technique de marquage spécifique des ARN sur support ARiBo. Ces coûts proviennent majoritairement de l'utilisation de deux composantes précises : la ligase à ARN 1 du phage T4 commerciale et la résine GSH-sépharose. Pour résoudre ce problème, certaines stratégies peuvent être appliquées afin de diminuer la quantité requise de ces deux composantes et ainsi d'abaisser le prix global de la technique.

Dans un premier temps, la production de ligase à ARN 1 T4 maison a été effectuée (Figure 35) à partir d'un protocole optimisé au laboratoire Unrau (Wang and Unrau 2002). Ce protocole permet de produire une enzyme menant à des rendements finaux de ligation très similaires à ceux obtenus à l'aide de la ligase à ARN 1 commerciale. De plus, la production de ligase à ADN du phage T4 maison est aussi possible (Rossi, Montecucco et al. 1997), ce qui permet de diminuer significativement les coûts de toute technique de marquage isotopique spécifique des ARN.

Afin de réduire la quantité de résine GSH-sépharose utilisée lors du marquage spécifique ARiBo, il est possible de régénérer cette résine à l'aide d'un traitement à la L-glutathione (Di Tomasso, Dagenais et al. 2012). Ce traitement permet d'éluier l'étiquette ARiBo, ainsi que la protéine N λ -GST toujours fixées sur la résine suite à la purification par affinité. Afin d'éliminer tout risque de contamination croisée, les résines régénérées ainsi devraient être utilisées strictement pour purifier un échantillon d'ARN identique à celui

préalablement fixé au support solide. Cette étape permet donc d'économiser de la résine fraîche et de diminuer les coûts de la stratégie de marquage spécifique d'environ 50 %. Les coûts d'obtention d'une quantité suffisante de résine GSH-sépharose demeurent toutefois très élevés (environ 900 \$ pour la production d'un seul échantillon de RMN), ce qui limite toujours l'utilisation de la stratégie de marquage spécifique sur support ARiBo.

4.3.5. Ligation sans support solide ARiBo

Afin d'évaluer la pertinence de la méthode développée, le protocole de marquage spécifique sur support solide ARiBo (Figure 26) est ensuite comparé à une stratégie similaire, effectuée sans support solide.

Premièrement, le marquage spécifique sans support solide exploite les mêmes stratégies d'incorporation du GMP^{15}N et de ligation enzymatique que celles utilisant le support solide ARiBo. Le fragment donneur est donc transcrit en présence d'un excès de GMP^{15}N et la ligation est effectuée à l'aide de la ligase à ARN 1 du phage T4 et d'un ADN d'appariement. Cependant, les étapes de purification sont différentes, car aucune étiquette d'affinité n'est utilisée. Deux purifications par électrophorèse sur gels dénaturants doivent donc être effectuées avant la ligation enzymatique, afin de purifier l'ARN donneur et l'ARN accepteur. De plus, une dernière étape de purification doit être effectuée afin d'éliminer les contaminants du produit de ligation à la toute fin du protocole. Ces trois étapes de purification nécessitent près d'une semaine de manipulations chacune, ce qui augmente considérablement le temps requis pour l'obtention d'un échantillon de RMN pur, obtenu par marquage spécifique sans étiquette ARiBo. Cette approche nécessite donc plusieurs semaines de travail en laboratoire afin d'obtenir un seul échantillon de RMN marqué spécifiquement. Cependant, les coûts de production de cet échantillon sont plus faibles, car cette stratégie ne requiert aucune résine GSH-sépharose.

Quant au marquage spécifique sur support ARiBo, il permet une purification rapide de l'ARN accepteur et élimine la nécessité de purifier l'ARN donneur avant l'étape de ligation, car celui-ci est fixé au support solide lors de la réaction de ligation. Cette technique permet d'obtenir un échantillon marqué spécifiquement en seulement deux jours de manipulations en laboratoire. Le produit obtenu doit toutefois être purifié, soit par électrophorèse sur gels dénaturants ou par chromatographie liquide, ce qui requière près d'une semaine de manipulations. De plus, l'utilisation de plusieurs dizaines de millilitres de résine GSH-sépharose est assez dispendieuse et limite l'application de cette méthode pour la production d'échantillons pouvant être étudiés par spectroscopie RMN.

L'utilisation d'une stratégie hybride, s'inspirant des deux approches présentées plus haut, permettrait alors d'effectuer un marquage spécifique plus rapide que la méthode sans support solide et moins dispendieux que celle utilisant l'étiquette ARiBo à chacune des étapes. Afin de concevoir cette stratégie, il est important de noter que la majorité des coûts associés à la technique de marquage spécifique ARiBo proviennent de la résine GSH-sépharose. Cette résine est utilisée à la fois pour la purification du fragment accepteur (RSA5') et pour la ligation sur support solide. La purification par affinité ARiBo du fragment accepteur procure un rendement d'environ 53 % et cet ARN doit être produit en excès par rapport au fragment donneur afin de réaliser la ligation enzymatique. Bref, ceci signifie qu'environ 75 % de la quantité totale de résine GSH-sépharose requise pour le marquage spécifique d'un échantillon de RMN (Tableau II) est utilisée afin de purifier le fragment accepteur. Or, une stratégie utilisant l'électrophorèse sur gels dénaturants afin de purifier le fragment accepteur et le produit final, jumelé à une ligation sur support solide ARiBo (Figure 36) permettrait alors d'abaisser les coûts du marquage spécifique d'environ 75 %, tout en produisant l'échantillon en seulement deux semaines de travail.

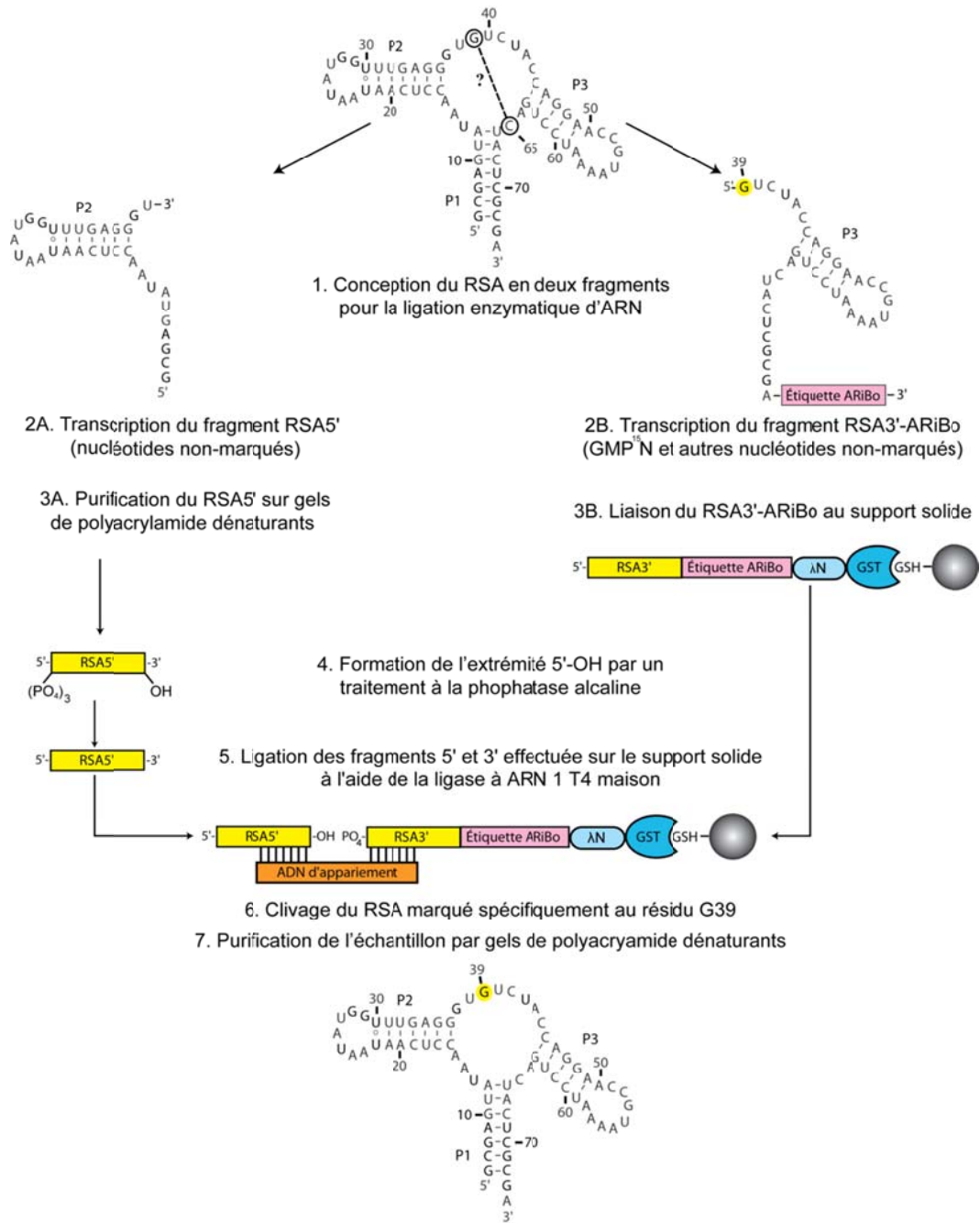


Figure 36 : Stratégie de marquage spécifique optimale utilisant à la fois la purification par affinité ARiBo et les gels dénaturants.

La stratégie de marquage spécifique illustrée à la Figure 26 est modifiée afin d'incorporer les étapes de purification sur gels dénaturants du fragment accepteur et du produit de

ligation final. Cette stratégie permet de produire un échantillon de RMN de RSA en seulement deux semaines de travail, tout en diminuant significativement les coûts de la technique.

La stratégie de marquage spécifique qui utilise le support ARiBo à chacune des étapes de purification est rapide et très efficace. Cette approche est optimale pour la production de quelques μ moles d'ARN d'intérêt et peut être utilisée afin de produire des échantillons servant à plusieurs types d'études différentes (incorporation de fluorophores, spectrométrie de masse, etc.). Cette technique paraît toutefois moins avantageuse pour la production d'une quantité d'ARN nécessaire aux études de spectroscopie RMN, car l'utilisation de résine GSH-sépharose à chacune des étapes de purification augmente considérablement le coût de production. La méthode hybride présentée à la Figure 36 est plus adaptée aux études de RMN, car elle utilise à la fois des purifications par électrophorèse sur gels dénaturants et par affinité sur support ARiBo. Cette nouvelle approche permet la production d'échantillons en seulement deux semaines de manipulation.

4.3.6. Comparaison aux stratégies déjà existantes

Un protocole récemment développé au laboratoire Tanaka (Kawahara, Haruta et al. 2012) permet d'effectuer un marquage isotopique spécifique similaire à celui présenté dans ce mémoire. Cette nouvelle stratégie emploie un intron du groupe I qui agit en *trans* afin de marquer spécifiquement une guanine à l'intérieur d'un ARN autrement non-marqué. Une réaction de transfert, catalysée par l'intron du groupe I en présence de GMP^{15}N et d'un fragment 3' précurseur permet d'incorporer spécifiquement le GMP^{15}N à l'extrémité 5' de l'ARN donneur. Ce fragment est ensuite purifié, puis ligué à un ARN accepteur à l'aide d'un ADN d'appariement et de la ligase à ADN du phage T4. Le produit est alors purifié par HPLC et l'échantillon est utilisé pour des études de spectroscopie RMN.

Cette nouvelle stratégie est efficace et procure des rendements globaux d'environ 19 % pour des ARN de taille similaire au RSA. L'utilisation de l'intron du groupe I est ingénieuse et permet d'incorporer spécifiquement le GMP¹⁵N à un site précis, tout en minimisant la quantité de nucléosides marqués utilisés. Ceci abaisse considérablement le coût de la technique lorsque les nucléosides marqués sont obtenus commercialement. La production de GMP¹⁵N maison, grâce au protocole de séparation par IP-HPLC présenté dans ce mémoire, est cependant très abordable, ce qui permet d'incorporer le GMP¹⁵N directement lors de la transcription enzymatique. Cette méthode est donc plus simple et plus rapide que l'utilisation de l'intron du groupe I.

La stratégie de marquage spécifique sur support ARiBo développée dans ce mémoire représente donc une alternative de choix au protocole du laboratoire Tanaka. L'initiation de la transcription en présence d'un excès de GMP¹⁵N, ainsi que l'utilisation du support solide ARiBo lors de la ligation enzymatique permet d'économiser énormément de temps par rapport aux autres techniques déjà existantes.

5. Conclusion

L'objectif principal des travaux présentés dans ce mémoire de maîtrise était d'explorer la possibilité d'utiliser la méthode de purification des ARN par affinité ARiBo afin d'élaborer une nouvelle technique de marquage isotopique spécifique des ARN fonctionnels.

Dans un premier temps, une stratégie de séparation préparative d'un mélange de NMP marqués isotopiquement a été développée. Cette approche, effectuée par IP-HPLC, permet d'obtenir une séparation à haute résolution de chacun des quatre ribonucléotides standards. Une étape de purification sur une colonne de HPLC en phase inverse est ensuite effectuée afin d'éliminer toute trace de solvants de séparation. Cette stratégie est rapide, efficace et permet l'obtention d'échantillons de NMP marqués isotopiquement, compatibles avec la transcription enzymatique de l'ARN.

Deuxièmement, la possibilité de cliver des molécules présentant d'autres nucléotides que l'adénine à la position N-1 du ribozyme *glmS* a été explorée. L'utilisation de conditions plus rigoureuses que celle traditionnellement utilisée permet un clivage très efficace, peu importe l'identité du nucléotide positionné immédiatement en amont de l'étiquette ARiBo. Cette nouvelle condition de clivage permet d'effectuer une purification par affinité ARiBo de molécules d'ARN qui possèdent une extrémité 3' stricte, comme celle de fragments accepteurs utilisés pour la ligation enzymatique.

Ensuite, une réaction de ligation enzymatique a été effectuée à l'aide d'un ARN donneur fixé au support solide ARiBo via une protéine Nλ-GST. Cette approche procure d'excellents rendements de ligation et l'étiquette ARiBo peut être utilisée par la suite afin d'éluer le produit ligué. Cependant, l'échantillon obtenu présente un degré de pureté

inadéquat pour effectuer des études structurales de spectroscopie RMN et doit subir une étape de purification supplémentaire afin d'éliminer les contaminants provenant de la ligation enzymatique.

Le coût associé à la stratégie de marquage spécifique qui utilise le support solide ARiBo à chacune des étapes de purification est élevé, ce qui réduit considérablement l'accessibilité de la méthode pour les budgets limités. Cependant, une nouvelle approche hybride, comportant à la fois des étapes de purification par électrophorèse sur gels dénaturants, ainsi qu'une ligation sur support solide ARiBo procure un marquage isotopique spécifique abordable et efficace, pouvant être effectué en seulement deux semaines de manipulations en laboratoire. Cette nouvelle approche devra toutefois être utilisée à grande échelle afin de démontrer son utilité. Par exemple, la production d'un échantillon de RSA marqué en ^{15}N au résidu G39 en suivant cette approche pourrait servir à effectuer des expériences de RMN hétéronucléaire simplifiées et à attribuer avec précision le signal correspondant au résidu G39 du riborégulateur mutant. La stratégie développée dans ce mémoire procure un outil rapide et efficace, servant à simplifier les études structurales d'ARN fonctionnels.

6. Annexes

6.1. Séquences des molécules d'ARN et d'ADN utilisées

Séquences d'ARN :

Étiquette ARiBo : 5'-GCGCCGAACUGGGCCCUGAAGAAGGGCUCAGUUGA
CGAGGUGGGGUUUAUCGAGAUUUCGGCGGAUGACU
CCCGGUUGUUCAUCAACCGCAAACUUUUACUUA
AAUCAUUAAGGUGACUUAGUGGACAAAGGUGAAA
GUGUGAU-3'

RSA5' : 5'-GCGAGUAUAACCUCAAUAAUAUGGUUUGAGGGU-3'

RSA3' : 5'-GUCUACCAGGAACCGUAAAUCCUGACUACUCGCGA-3'

RSA : 5'-GCGAGUAUAACCUCAAUAAUAUGGUUUGAGGGUGUCUA
CCAGGAACCGUAAAUCCUGACUACUCGCGA-3'

RSA Δ G : 5'-GCGAGUAUAACCUCAAUAAUAUGGUUUGAGGGUGUCUA
CCAGGAACCGUAAAUCCUGACUACUCGC-3'

RSAA74C: 5'-GCGAGUAUAACCUCAAUAAUAUGGUUUGAGGGU
GUCUACCAGGAACCGUAAAUCCUGACUACUCGC
GC-3'

RSAA74G: 5'-GCGAGUAUAACCUCAAUAAUAUGGUUUGAGGGU
GUCUACCAGGAACCGUAAAUCCUGACUACUCGC
GG-3'

RSAA74U: 5'-GCGAGUAUAACCUCAAUAAUAUGGUUUGAGGGU
GUCUACCAGGAACCGUAAAUCCUGACUACUCGC
GU-3'

Séquences d'ADN :

ADN d'appariement I: 5'-G TTCCTGGTAGACACCCTCAAACCAT-3'

ADN d'appariement II: 5'-TAC GGT TCC TGG TAG CAA ACC ATA TTA TTG
AGG-3'

7. Bibliographie

- Amitsur, M., R. Levitz, et al. (1987). "Bacteriophage T4 anticodon nuclease, polynucleotide kinase and RNA ligase reprocess the host lysine tRNA." EMBO J **6**(8): 2499-2503.
- Anderson, A. C., S. A. Scaringe, et al. (1996). "HPLC purification of RNA for crystallography and NMR." RNA **2**(2): 110-117.
- Austin, R. J., T. Xia, et al. (2002). "Designed arginine-rich RNA-binding peptides with picomolar affinity." J Am Chem Soc **124**(37): 10966-10967.
- Azarani, A. and K. H. Hecker (2001). "RNA analysis by ion-pair reversed-phase high performance liquid chromatography." Nucleic Acids Res **29**(2): E7.
- Barrick, J. E., K. A. Corbino, et al. (2004). "New RNA motifs suggest an expanded scope for riboswitches in bacterial genetic control." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(17): 6421-6426.
- Batey R.T., J. L. Battiste, et al. (1995). "Preparation of isotopically enriched RNAs for heteronuclear NMR." (0076-6879 (Print)).
- Batey, R. T., J. L. Battiste, et al. (1995). "Preparation of isotopically enriched RNAs for heteronuclear NMR." Methods Enzymol **261**: 300-322.
- Batey, R. T., M. Inada, et al. (1992). "Preparation of isotopically labeled ribonucleotides for multidimensional NMR spectroscopy of RNA." (0305-1048 (Print)).
- Batey, R. T. and J. S. Kieft (2007). "Improved native affinity purification of RNA." RNA **13**(8): 1384-1389.
- Breaker, R. R. (2011). "Prospects for riboswitch discovery and analysis." Mol Cell **43**(6): 867-879.
- Caruthers, M. H. (2011). "A brief review of DNA and RNA chemical synthesis." Biochem Soc Trans **39**(2): 575-580.
- Cavaluzzi, M. J. and P. N. Borer (2004). "Revised UV extinction coefficients for nucleoside-5'-monophosphates and unpaired DNA and RNA." Nucleic Acids Res **32**(1): e13.
- Cecchi, T. (2008). "Ion Pairing Chromatography." Critical Review in Analytical Chemistry(38): 161-213.

- Cheong, H. K., E. Hwang, et al. (2004). "Rapid preparation of RNA samples for NMR spectroscopy and X-ray crystallography." Nucleic Acids Res **32**(10): e84.
- Cochrane, J. C., S. V. Lipchock, et al. (2007). "Structural investigation of the GlmS ribozyme bound to Its catalytic cofactor." Chem Biol **14**(1): 97-105.
- Cohn, W. E. (1950). "The Anion-Exchange separation of ribonucleotides." J. Am. Chem. Soc. **72**: 1471-1478.
- Cohn, W. E. (1950). "The Anion-Exchange Separation of Ribonucleotides." Journal of the American Chemical Society **72**(4): 1471-1478.
- Coleman, T. M., G. Wang, et al. (2004). "Superior 5' homogeneity of RNA from ATP-initiated transcription under the T7 phi 2.5 promoter." Nucleic Acids Res **32**(1): e14.
- Dagenais, P. and P. Legault (2012). "Preparative separation of ribonucleoside monophosphates by ion-pair reverse-phase HPLC." Methods Mol Biol **941**: 247-256.
- Dekker, N. H., J. A. Abels, et al. (2004). "Joining of long double-stranded RNA molecules through controlled overhangs." Nucleic Acids Res **32**(18): e140.
- Delfosse, V., P. Bouchard, et al. (2010). "Riboswitch structure: an internal residue mimicking the purine ligand." Nucleic Acids Res **38**(6): 2057-2068.
- Desjardins, G., E. Bonneau, et al. (2011). "NMR structure of the A730 loop of the Neurospora VS ribozyme: insights into the formation of the active site." Nucleic Acids Res **39**(10): 4427-4437.
- Di Tomasso, G., P. Dagenais, et al. (2012). "Affinity Purification of RNA Using an ARiBo Tag." Methods Mol Biol **941**: 137-155.
- Di Tomasso, G., P. Lampron, et al. (2011). "The ARiBo tag: a reliable tool for affinity purification of RNAs under native conditions." Nucleic Acids Res **39**(3): e18.
- Dieckmann, T., E. Suzuki, et al. (1996). "Solution structure of an ATP-binding RNA aptamer reveals a novel fold." RNA **2**(7): 628-640.
- Dieckmann, T., E. Suzuki, et al. (1996). "Solution structure of an ATP-binding RNA aptamer reveals a novel fold." Rna **2**(7): 628-640.
- Dieckmann, T. L., P. (2008). Biomolecular NMR Spectroscopy of Ribonucleic Acids. eLS, John Wiley & Sons, Ltd.

- Dolinnaya, N. G., N. I. Sokolova, et al. (1991). "The use of BrCN for assembling modified DNA duplexes and DNA-RNA hybrids; comparison with water-soluble carbodiimide." Nucleic Acids Res **19**(11): 3067-3072.
- Duss, O., C. Maris, et al. (2010). "A fast, efficient and sequence-independent method for flexible multiple segmental isotope labeling of RNA using ribozyme and RNase H cleavage." Nucleic Acids Res **38**(20): e188.
- Easton, L. E., Y. Shibata, et al. (2010). "Rapid, nondenaturing RNA purification using weak anion-exchange fast performance liquid chromatography." RNA **16**(3): 647-653.
- Edwards, T. E. and A. R. Ferre-D'Amare (2006). "Crystal structures of the thi-box riboswitch bound to thiamine pyrophosphate analogs reveal adaptive RNA-small molecule recognition." Structure **14**(9): 1459-1468.
- El-Sagheer, A. H. and T. Brown (2010). "New strategy for the synthesis of chemically modified RNA constructs exemplified by hairpin and hammerhead ribozymes." Proc Natl Acad Sci U S A **107**(35): 15329-15334.
- Frilander, M. J. and J. J. Turunen (2005). RNA Ligation using T4 DNA Ligase. Handbook of RNA Biochemistry.
- Fritz, J. S. (2005). "Factors affecting selectivity in ion chromatography." J Chromatogr A **1085**(1): 8-17.
- Gilbert, S. D., C. D. Stoddard, et al. (2006). "Thermodynamic and kinetic characterization of ligand binding to the purine riboswitch aptamer domain." J Mol Biol **359**(3): 754-768.
- Gruegelsiepe, H., A. Schön, et al. (2005). Enzymatic RNA Synthesis using Bacteriophage T7 RNA Polymerase. Handbook of RNA Biochemistry.
- Harding, D. R., C. A. Bishop, et al. (1981). "Use of perfluoroalkanoic acids as volatile ion pairing reagents in preparative HPLC." Int J Pept Protein Res **18**(2): 214-220.
- Hartmann, R. K., A. Bindereif, et al. (2005). "Appendix: UV Spectroscopy for the Quantitation of RNA, in Handbook of RNA Biochemistry."
- Haynie, S. L. and G. M. Whitesides (1990). "Preparation of a mixture of nucleoside triphosphates suitable for use in synthesis of nucleotide phosphate sugars from ribonucleic acid using nuclease P1, a mixture of nucleoside monophosphokinases and acetate kinase." Appl Biochem Biotechnol **23**(3): 205-220.

- Heaphy, S., M. Singh, et al. (1987). "Effect of single amino acid changes in the region of the adenylation site of T4 RNA ligase." Biochemistry **26**(6): 1688-1696.
- Hines, J. V., S. M. Landry, et al. (1994). "Carbon-Proton Scalar Couplings in RNA: 3D Heteronuclear and 2D Isotope-Edited NMR of a ¹³C-Labeled Extra-stable Hairpin." Journal of the American Chemical Society **116**(13): 5823-5831.
- Hobartner, C., R. Rieder, et al. (2005). "Syntheses of RNAs with up to 100 nucleotides containing site-specific 2'-methylseleno labels for use in X-ray crystallography." J Am Chem Soc **127**(34): 12035-12045.
- Hobartner, C. and S. K. Silverman (2007). "Recent advances in DNA catalysis." Biopolymers **87**(5-6): 279-292.
- Hoffman, N. E. and J. C. Liao (1977). "Reversed phase high performance liquid chromatographic separations of nucleotides in the presence of solvophobic ions." Anal Chem **49**(14): 2231-2234.
- Huang, F., G. Wang, et al. (2003). "Synthesis of adenosine derivatives as transcription initiators and preparation of 5' fluorescein- and biotin-labeled RNA through one-step in vitro transcription." RNA **9**(12): 1562-1570.
- Ip, C. Y., D. Ha, et al. (1985). "Separation of nucleosides and nucleotides by reversed-phase high-performance liquid chromatography with volatile buffers allowing sample recovery." Anal Biochem **147**(1): 180-185.
- Jaikaran, D., M. D. Smith, et al. (2008). "An important role of G638 in the cis-cleavage reaction of the Neurospora VS ribozyme revealed by a novel nucleotide analog incorporation method." RNA **14**(5): 938-949.
- Kao, C., M. Zheng, et al. (1999). "A simple and efficient method to reduce nontemplated nucleotide addition at the 3 terminus of RNAs transcribed by T7 RNA polymerase." RNA **5**(9): 1268-1272.
- Kawahara, I., K. Haruta, et al. (2012). "Site-specific isotope labeling of long RNA for structural and mechanistic studies." Nucleic Acids Res **40**(1): e7.
- Kieft, J. S. and R. T. Batey (2004). "A general method for rapid and nondenaturing purification of RNAs." RNA **10**(6): 988-995.
- Kim, I., P. J. Lukavsky, et al. (2002). "NMR study of 100 kDa HCV IRES RNA using segmental isotope labeling." J Am Chem Soc **124**(32): 9338-9339.

- Kim, I., S. A. McKenna, et al. (2007). "Rapid purification of RNAs using fast performance liquid chromatography (FPLC)." RNA **13**(2): 289-294.
- Kinoshita, Y., K. Nishigaki, et al. (1997). "Fluorescence-, isotope- or biotin-labeling of the 5'-end of single-stranded DNA/RNA using T4 RNA ligase." Nucleic Acids Res **25**(18): 3747-3748.
- Klein, D. J. and A. R. Ferre-D'Amare (2006). "Structural basis of glmS ribozyme activation by glucosamine-6-phosphate." Science **313**(5794): 1752-1756.
- Klein, D. J., S. R. Wilkinson, et al. (2007). "Requirement of helix P2.2 and nucleotide G1 for positioning the cleavage site and cofactor of the glmS ribozyme." J Mol Biol **373**(1): 178-189.
- Kleppe, K., J. H. Van de Sande, et al. (1970). "Polynucleotide ligase-catalyzed joining of deoxyribo-oligonucleotides on ribopolynucleotide templates and of ribo-oligonucleotides on deoxyribopolynucleotide templates." Proc Natl Acad Sci U S A **67**(1): 68-73.
- Krstulovic, A. M., P. R. Brown, et al. (1977). "Identification of nucleosides and bases in serum and plasma samples by reverse-phase high performance liquid chromatography." Anal Chem **49**(14): 2237-2241.
- Kurata, S., T. Ohtsuki, et al. (2003). "Quick two-step RNA ligation employing periodate oxidation." Nucleic Acids Res **31**(22): e145.
- Kurschat, W. C., J. Muller, et al. (2005). "Optimizing splinted ligation of highly structured small RNAs." RNA **11**(12): 1909-1914.
- Lambert, J. B., Mazzola, E.P. (2003). "Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy an Introduction to Principles, Applications and Experimental Methods." Pearson Education Inc.: 368.
- Lemay, J. F. and D. A. Lafontaine (2007). "Core requirements of the adenine riboswitch aptamer for ligand binding." RNA **13**(3): 339-350.
- Li, Y., E. Wang, et al. (1999). "A modified procedure for fast purification of T7 RNA polymerase." Protein Expr Purif **16**(2): 355-358.
- Lindahl, T. and D. E. Barnes (1992). "Mammalian DNA ligases." Annu Rev Biochem **61**: 251-281.
- Lu, K., Y. Miyazaki, et al. (2010). "Isotope labeling strategies for NMR studies of RNA." J Biomol NMR **46**(1): 113-125.

- Lukavsky, P. J., I. Kim, et al. (2003). "Structure of HCV IRES domain II determined by NMR." Nat Struct Biol **10**(12): 1033-1038.
- Lukavsky, P. J. and J. D. Puglisi (2004). "Large-scale preparation and purification of polyacrylamide-free RNA oligonucleotides." RNA **10**(5): 889-893.
- Mandal, M., B. Boese, et al. (2003). "Riboswitches control fundamental biochemical pathways in Bacillus subtilis and other bacteria." Cell **113**(5): 577-586.
- Mandal, M. and R. R. Breaker (2004). "Adenine riboswitches and gene activation by disruption of a transcription terminator." Nat Struct Mol Biol **11**(1): 29-35.
- Meylan, F. (2007). "Optimized methods for the enzymatic ligation of oligoribonucleotides and analogues." Thèse de doctorat, École polytechnique fédérale de lausanne.
- Michnicka, M. J., J. W. Harper, et al. (1993). "Selective isotopic enrichment of synthetic RNA: application to the HIV-1 TAR element." Biochemistry **32**(2): 395-400.
- Milligan, J. F., D. R. Groebe, et al. (1987). "Oligoribonucleotide synthesis using T7 RNA polymerase and synthetic DNA templates." Nucleic Acids Res **15**(21): 8783-8798.
- Milligan, J. F. and O. C. Uhlenbeck (1989). "Synthesis of small RNAs using T7 RNA polymerase." Methods Enzymol **180**: 51-62.
- Mitra, D. and M. J. Damha (2007). "A novel approach to the synthesis of DNA and RNA lariats." J Org Chem **72**(25): 9491-9500.
- Montange, R. K. and R. T. Batey (2006). "Structure of the S-adenosylmethionine riboswitch regulatory mRNA element." Nature **441**(7097): 1172-1175.
- Moore, M. J. (1999). "Joining RNA molecules with T4 DNA ligase." Methods Mol Biol **118**: 11-19.
- Mörl, M., E. Lizano, et al. (2005). "Production of RNAs with Homogeneous 5' and 3' Ends."
- Mutisya, D., C. Selvam, et al. (2011). "Synthesis and properties of triazole-linked RNA." Bioorg Med Chem Lett **21**(11): 3420-3422.
- Nandakumar, J., C. K. Ho, et al. (2004). "RNA substrate specificity and structure-guided mutational analysis of bacteriophage T4 RNA ligase 2." J Biol Chem **279**(30): 31337-31347.

- Nelissen, F. H., A. J. van Gammeren, et al. (2008). "Multiple segmental and selective isotope labeling of large RNA for NMR structural studies." Nucleic Acids Res **36**(14): e89.
- Nichols, N. M., S. Tabor, et al. (2008). "RNA ligases." Curr Protoc Mol Biol **Chapter 3**: Unit3 15.
- Nikonowicz, E. P., A. Sirt, et al. (1992). "Preparation of ¹³C and ¹⁵N labelled RNAs for heteronuclear multi-dimensional NMR studies." Nucleic Acids Res **20**(17): 4507-4513.
- Noll, B., S. Seiffert, et al. (2011). "Characterization of small interfering RNA by non-denaturing ion-pair reversed-phase liquid chromatography." J Chromatogr A **1218**(33): 5609-5617.
- Novogrodsky, A., M. Tal, et al. (1966). "The enzymatic phosphorylation of ribonucleic acid and deoxyribonucleic acid. II. Further properties of the 5'-hydroxyl polynucleotide kinase." J Biol Chem **241**(12): 2933-2943.
- Ohtsuki, T., G. Kawai, et al. (1998). "Stable isotope-edited NMR analysis of *Ascaris suum* mitochondrial tRNAMet having a TV-replacement loop." J Biochem **124**(1): 28-34.
- Ohtsuki, T., G. Kawai, et al. (1996). "Preparation of biologically active *Ascaris suum* mitochondrial tRNAMet with a TV-replacement loop by ligation of chemically synthesized RNA fragments." Nucleic Acids Res **24**(4): 662-667.
- Palmer, J. L. and J. Avruch (1981). "A rapid and convenient method for preparing salt-free [γ -³²P]ATP." Anal Biochem **116**(2): 372-373.
- Paredes, E. and S. R. Das (2011). "Click chemistry for rapid labeling and ligation of RNA." ChemBiochem **12**(1): 125-131.
- Paredes, E., M. Evans, et al. (2011). "RNA labeling, conjugation and ligation." Methods **54**(2): 251-259.
- Persson, T., D. K. Willkomm, et al. (2005). T4 RNA Ligase. Handbook of RNA Biochemistry.
- Pitulle, C., R. G. Kleinedam, et al. (1992). "Initiator oligonucleotides for the combination of chemical and enzymatic RNA synthesis." Gene **112**(1): 101-105.
- Purtha, W. E., R. L. Coppins, et al. (2005). "General deoxyribozyme-catalyzed synthesis of native 3'-5' RNA linkages." J Am Chem Soc **127**(38): 13124-13125.

- Rastogi, T., T. L. Beattie, et al. (1996). "A long-range pseudoknot is required for activity of the Neurospora VS ribozyme." EMBO J **15**(11): 2820-2825.
- Romaniuk, E., L. W. McLaughlin, et al. (1982). "The effect of acceptor oligoribonucleotide sequence on the T4 RNA ligase reaction." Eur J Biochem **125**(3): 639-643.
- Rossi, R., A. Montecucco, et al. (1997). "Functional characterization of the T4 DNA ligase: a new insight into the mechanism of action." Nucleic Acids Res **25**(11): 2106-2113.
- Roth, A., A. Nahvi, et al. (2006). "Characteristics of the glmS ribozyme suggest only structural roles for divalent metal ions." RNA **12**(4): 607-619.
- Rule, G. S. H., T.K. (2006). "Fundamentals of Protein NMR Spectroscopy." Springer **5**: 556.
- Sampson, J. R. and O. C. Uhlenbeck (1988). "Biochemical and physical characterization of an unmodified yeast phenylalanine transfer RNA transcribed in vitro." Proc Natl Acad Sci U S A **85**(4): 1033-1037.
- Schott, H., E. Rudloff, et al. (1973). "A dihydroxyboryl-substituted methacrylic polymer for the column chromatographic separation of mononucleotides, oligonucleotides, and transfer ribonucleic acid." Biochemistry **12**(5): 932-938.
- Scott, W. G. (2007). "Ribozymes." Curr Opin Struct Biol **17**(3): 280-286.
- Serganov, A., Y. R. Yuan, et al. (2004). "Structural basis for discriminative regulation of gene expression by adenine- and guanine-sensing mRNAs." Chem Biol **11**(12): 1729-1741.
- Shields, T. P., E. Mollova, et al. (1999). "High-performance liquid chromatography purification of homogenous-length RNA produced by trans cleavage with a hammerhead ribozyme." RNA **5**(9): 1259-1267.
- Simon, E. S., S. Grabowski, et al. (1990). "Convenient syntheses of cytidine 5'-triphosphate, guanosine 5'-triphosphate, and uridine 5'-triphosphate and their use in the preparation of UDP-glucose, UDP-glucuronic acid, and GDP-mannose." The Journal of Organic Chemistry **55**(6): 1834-1841.
- Sokolova, N. I., D. T. Ashirbekova, et al. (1988). "Chemical reactions within DNA duplexes. Cyanogen bromide as an effective oligodeoxyribonucleotide coupling agent." FEBS Lett **232**(1): 153-155.
- Stark, M. R., J. A. Pleiss, et al. (2006). "An RNA ligase-mediated method for the efficient creation of large, synthetic RNAs." RNA **12**(11): 2014-2019.

- Uesugi, T., K. Sano, et al. (1997). "Ion-pair reversed-phase high-performance liquid chromatography of adenine nucleotides and nucleoside using triethylamine as a counterion." J Chromatogr B Biomed Sci Appl **703**(1-2): 63-74.
- Walseth, T. F., G. Graff, et al. (1980). "Separation of 5'-ribonucleoside monophosphates by ion-pair reverse-phase high-performance liquid chromatography." Anal Biochem **107**(1): 240-245.
- Wang, Q. S. and P. J. Unrau (2002). "Purification of histidine-tagged T4 RNA ligase from *E. coli*." Biotechniques **33**(6): 1256-1260.
- Winkler, W., A. Nahvi, et al. (2002). "Thiamine derivatives bind messenger RNAs directly to regulate bacterial gene expression." Nature **419**(6910): 952-956.
- Winkler, W. C., A. Nahvi, et al. (2004). "Control of gene expression by a natural metabolite-responsive ribozyme." Nature **428**(6980): 281-286.
- Wyatt, J. R., M. Chastain, et al. (1991). "Synthesis and purification of large amounts of RNA oligonucleotides." Biotechniques **11**(6): 764-769.
- Zhu, H., P. Smith, et al. (2007). "Structure-function analysis of the 3' phosphatase component of T4 polynucleotide kinase/phosphatase." Virology **366**(1): 126-136.

