



**HAL**  
open science

# Étude de la dynamique de Let-7 par RMN très hauts champs

Maxime Borret

► **To cite this version:**

Maxime Borret. Étude de la dynamique de Let-7 par RMN très hauts champs. Sciences du Vivant [q-bio]. 2020. dumas-03038538

**HAL Id: dumas-03038538**

**<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-03038538v1>**

Submitted on 3 Dec 2020

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

<p>Année universitaire : 2019-2020</p> <p>Spécialité : Ingénieur Agronome</p> <p>Spécialisation (et option éventuelle) : Biologie Moléculaire et Cellulaire</p>	<p><b>Mémoire de fin d'études</b></p> <p><input checked="" type="checkbox"/> d'ingénieur de l'École nationale supérieure des sciences agronomiques, agroalimentaires, horticoles et du paysage (AGROCAMPUS OUEST), école interne de l'institut national d'enseignement supérieur pour l'agriculture, l'alimentation et l'environnement</p> <p><input type="checkbox"/> de master de l'École nationale supérieure des sciences agronomiques, agroalimentaires, horticoles et du paysage (AGROCAMPUS OUEST), école interne de l'institut national d'enseignement supérieur pour l'agriculture, l'alimentation et l'environnement</p> <p><input type="checkbox"/> d'un autre établissement (étudiant arrivé en M2)</p>
---	---

## Etude de la dynamique de Let-7 par RMN très hauts champs

Maxime BORRET



**Soutenu à Villeurbanne par visioconférence le 17/06/2020**

**Devant le jury composé de :**

- **Frédéric Lecerf**, enseignant chercheur à Agrocampus Ouest (Rennes), département des productions animales, agroalimentaires, nutrition (P3AN)
- **Emmanuel Giudice**, Maître de conférences à l'université de Rennes 1 – Institut de génétique et développement de Rennes (IGDR)

Maître de stage : Loïc SALMON

Enseignant référent : Jean-Marc FRASLIN

*Les analyses et les conclusions de ce travail d'étudiant n'engagent que la responsabilité de son auteur et non celle d'AGROCAMPUS OUEST*

## ***Remerciements***

Je tiens d'abord à remercier le Dr. Loïc SALMON de m'avoir accueilli chaleureusement au sein de son équipe dans le cadre de mon stage de fin d'études. Ses conseils d'une grande justesse ainsi que son encadrement m'ont permis d'appréhender ce sujet ambitieux à l'interface entre la biologie et la physique.

Je tiens aussi à remercier Mme Sirine NOURI, Mme Emeline MESTDACH, le Dr. Landry GAYET et Mme Cécile CHAMIGNON ainsi que toute l'équipe du CRMN pour tout le soutien qu'ils m'ont apporté pour le bon déroulement de ce projet ainsi que pour leur bienveillance.

Je tiens aussi à remercier M. Jean-Marc FRASLIN d'Agrocampus Ouest d'avoir accepté d'être mon tuteur pour ce projet. Son suivi et ses remarques ont été précieux pour la bonne conduite de ce projet dans cette situation épidémique particulière.

Je tiens enfin à remercier Mme Sandrine LAGARRIGUE et M. Luc PAILLARD, responsables du master BMC qui ont veillé au bon déroulement de ce stage de fin d'études, pour qu'il se fasse dans les meilleures conditions possibles dans ce contexte spécial.

### Liste des abréviations :

ADN : Acide désoxyribonucléique  
ARN : Acide ribonucléique  
RMN : Résonance magnétique nucléaire  
ARNmi : Micro acide ribonucléique  
RISC : *RNA induced-silencing complex*  
Let-7 : *Lethal-7*  
HMGA2 : *High Mobility Group A2*  
TRIM71 : *Tripartite Motif containing 71*  
HPLC : *High Performance Liquid Chromatography*  
R<sub>1ρ</sub> : Relaxation dans le référentiel tournant  
CPMG : séquence de Carr-Purcell-Meiboom-Gill  
LB : *Lysogeny Broth*  
RPM : Rotations par minutes  
PEG : Polyéthylèneglycol  
DMSO : Diméthylsulfoxyde  
EDTA : Ethylènediaminetétraacétique  
NTP : Nucléotide triphosphate  
HSQC : *Heteronuclear single quantum correlation*  
RNase : Ribonucléase

L'information génétique de l'organisme est codée par l'ADN, lui-même transcrit en ARN, et lui-même traduit en protéine. Ce postulat est valable pour un certain nombre de gènes, mais tous les transcrits ne suivent pas cette règle. En effet, il existe des familles d'ARN nommés ARN non-codants, qui ne codent pas pour des protéines (MacFarlane, R. Murphy 2010). Le monde scientifique commence depuis quelques décennies à s'intéresser de manière précise à ces ARN, et en particulier aux micro-ARN (ARNmi), puisqu'il s'agit d'une voie de régulation de l'expression génétique non négligeable pour la cellule reposant sur le phénomène d'interférence ARN (Rana 2007). Les ARNmi interagissent via des complexes ribonucléoprotéiques, appelés RISC (*RNA induced-silencing complex*), avec leurs partenaires, et assurent le bon fonctionnement de la cellule grâce à un contrôle sur de nombreux mécanismes essentiels. Cependant, afin de mieux comprendre le fonctionnement exact de cette régulation, il est important de bien saisir au niveau atomique l'interaction qui existe entre un ARNmi et son partenaire. La technologie de choix pour observer ces processus dynamiques à haute résolution est la résonance magnétique nucléaire (RMN) (Bothe et al. 2011).

Dans ce mémoire, nous allons essayer de comprendre les modalités d'interaction de l'ARNmi *hsa-Let-7a-5p* noté Let-7 (Roush, Slack 2008) avec les cibles HMGA2 (Lee, Dutta 2007), LIN28A/B (Balzeau et al. 2017), et TRIM71 (Yin et al. 2016), connue dans la littérature pour interagir avec ce dernier dans le cadre de pathologies comme le cancer. Nous allons ici décrire la démarche scientifique suivie pour l'étude de la dynamique de Let-7 et de ses interactions avec ses partenaires, en détaillant la préparation des échantillons pour les expériences de spectroscopie, ainsi que les expériences de relaxation-dispersion que nous aurions voulu mettre en place.

### ***Démarche scientifique***

La principale contrainte qui a conditionné notre design expérimental est la quantité de matériel biologique nécessaire à la réalisation d'expériences de spectroscopie RMN (Fürtig et al. 2003). En effet, la RMN nécessite plusieurs milligrammes d'ARN ce qui représente une quantité conséquente d'échantillon, et un coût non négligeable pour le laboratoire (Baronti et al. 2018). Il est donc important de mettre en place une méthode robuste et efficace nous permettant de produire nous-même Let-7 ainsi que ses partenaires, en quantité suffisante et à

un coût maîtrisé. Il faut donc d'abord valider le protocole à une échelle de production faible avant de l'appliquer à l'échelle de l'échantillon de RMN.

Notre stratégie repose sur l'utilisation initiale d'une séquence synthétisée chimiquement d'ADN de Let-7, que l'on va amplifier dans un plasmide bactérien puis extraire par lyse cellulaire. Cette séquence synthétique est un triplicata de la séquence originelle, puisque l'enzyme T7 polymérase utilisée pour la transcription *in vitro* fonctionne mieux sur des séquences longues, la construction permettant aussi d'ajouter une séquence promotrice favorisant l'encrage de cette polymérase. L'avantage de cette approche repose sur la forte capacité de multiplication des bactéries, ce qui permet d'alimenter rapidement la chaîne de production de modèle d'ADN. Le plasmide amplifié est ensuite digéré par des enzymes de restriction, puis séparé par migration sur gel d'agarose pour pouvoir récupérer uniquement la séquence d'intérêt. On utilise ensuite cette dernière pour une transcription *in vitro* pour synthétiser l'ARN d'intérêt. L'intérêt de cette synthèse est l'utilisation possible de nucléotides marqués isotopiquement avec des noyaux  $^{13}\text{C}$  et  $^{15}\text{N}$  qui sont visibles en RMN, contrairement à leurs autres isotopes plus abondants. Le transcrit est ensuite extrait par HPLC en conditions dénaturantes, afin de séparer ce transcrit de tous ceux non conformes. On le purifie ensuite par extraction butanol et évaporation sous vide avant de le resuspendre dans un tampon deutéré pour les expériences de RMN.

Pour l'expérience RMN, on choisit l'expérience à réaliser en fonction du mécanisme dynamique que l'on estime le plus probable. Dans le cas de Let-7, on suppose que le mécanisme dynamique est un phénomène d'échange entre plusieurs configurations en absence ou en présence de ses partenaires. De ce fait, comme présenté dans le mémoire bibliographique, des expériences de  $R_{1\rho}$  ou de CPMG sont à prévoir pour observer la dynamique dudit ARNmi. C'est en effet l'approche la plus intéressante et la plus performante pour l'étude de phénomènes d'échange par RMN. Cette stratégie devrait être appliquée pour chacun des partenaires de Let-7 présenté. La stratégie suivie peut être résumée dans le schéma présenté en Figure 1.

A cause du confinement lié à la crise sanitaire du Covid-19, entraînant une fermeture complète du laboratoire, le protocole expérimental n'a pu être réalisé que jusqu'à la transcription *in vitro* (incluse). Néanmoins j'ai eu la possibilité avant le confinement de me former pour les étapes suivantes en particulier pour la purification HPLC et l'analyse RMN.

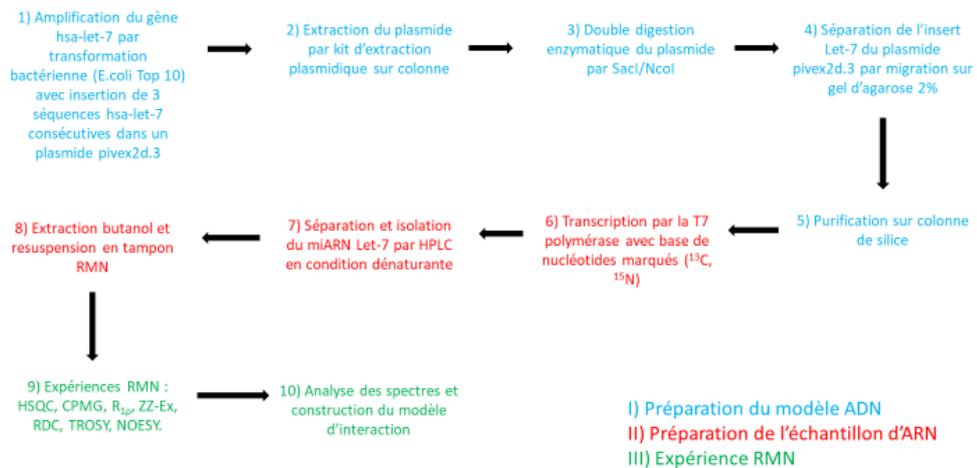


Figure 1 : Schéma bilan de la démarche scientifique du projet

## Matériel et méthodes

### Design du modèle Let-7 de synthèse

Le design de la séquence Let-7 synthétique utilisée pour l'amplification a été réalisé dans notre laboratoire par Landry GAYET. Elle a été commandée à Eurogentec et utilisée dans un plasmide pIvex2.3d (Roche) grâce à la technologie In-Fusion (Takara), donnant la construction pIVEX2.3d-Let7 MIRNA qui a été utilisée par la suite pour l'amplification bactérienne. La séquence utilisée est la suivante, la séquence de Let-7 (présente trois fois) étant indiquée en gras :

5'TAATACGACTCACTATAGGGATCGGTTGTATAGTTT**GAGGTAGTAGGTTGTATAGTTT**  
**GAGGTAGTAGGTTGTATAGTTT**GAGGTAGTAGGTTGTATAGTTT**GAGGTAGGCAACAT**  
GCTTCGGCATGG3'

### Amplification et extraction du modèle Let-7

Des bactéries *E.coli* chimio-compétentes Top 10 (préparées au laboratoire) sont transformées avec ce même plasmide à 0°C pendant 15min, puis amplifiées pendant 12h à 37°C et 270rpm sur du milieu LB Agar (préparé au laboratoire). Des clones sont ensuite prélevés puis amplifiés en culture LB liquide (préparée au laboratoire), successivement dans

15mL (8h) puis 2L (2h) de milieu à 37°C et 270rpm. Suite à cela, les clones sont lysés et le plasmide d'intérêt extrait sur colonne de silice avec des kits d'extraction Maxi Prep (Macherey Nagel). L'ADN est ensuite dosé par UV (Nanodrop), puis subit une double digestion avec le couple d'enzymes de restriction SacI/NcoI. La validité de cette dernière est vérifiée avec migration sur gel d'agarose 2%.

### *Séparation par taille*

Par gel : Après digestion, l'insert d'intérêt contenant la séquence de Let-7 est séparé du reste du plasmide par migration à 100V/30min sur gel d'agarose 2%. La bande contenant l'insert est découpée et le modèle ADN extrait au thiocyanate de guanidine est purifié sur colonne de silice avec lavage à l'éthanol 70% puis solubilisé en eau. L'ADN est finalement dosé par Nanodrop, aliquoté et stocké à -20°C.

Par billes magnétiques : Des billes magnétiques NGS clean-up size (Macherey Nagel) sont utilisées successivement avec des ratios billes/échantillon de 0.5/1 pour une exclusion du plasmide et de 1.8/1 pour récupérer l'insert, avec lavage à l'éthanol 70% et solubilisation en eau.

Par filtration : L'échantillon est filtré sur Amicon cutoff100kDa Merck à 11000g pendant 30min, puis récupération de la fraction correspondant à l'insert.

### *Transcription in vitro d'échantillons*

La réaction de transcription se fait en milieu RNAse free à 37°C pendant 4h à 300rpm, avec ajout d'EDTA 0.5M pH=8 à la fin du temps d'incubation, à partir du modèle ADN précédemment obtenu. La composition standard en volume d'un mix pour une transcription est la suivante : 20% PEG 8000, 20% DMSO, 8% H<sub>2</sub>O, 10% Buffer 10X, 10% MgCl<sub>2</sub> (0,28M), 16% de mix NTP (25 mM de chaque), 8% ADN et 8% de T7 polymérase, cette dernière étant produite au laboratoire. Le volume total d'un mix de transcription petite échelle est de 25µL, pour 3mL pour une transcription grande échelle. La transcription est suivie par migration 45min à 240V sur gel de polyacrylamide 15% en conditions dénaturantes et révélation par SYBR-Safe 1/10000.

### *Purification et préparation d'échantillon RMN*

L'ARN d'intérêt est séparé des autres transcrits par *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC) en conditions dénaturantes. Un gradient de sels est réalisé grâce à deux tampons : A (12,5mM Tris-HCl + 6M urée ; pH=8) et B (12,5mM Tris-HCl + 6M urée + 0,5M NaClO<sub>4</sub>). Le gradient de sel est optimisé sur HPLC analytique (détection UV) pour obtenir un gradient allant de 2% à 98% de tampon B en 15min à un débit de 0,5mL/min. Une fois cette optimisation réalisée le protocole est transporté sur HPLC préparative, en utilisant des conditions identiques mais un débit de 20mL/min, pour extraire l'ARN d'intérêt. L'ARN est ensuite extrait du milieu dénaturant par extraction au butanol et lyophilisation.

A cette étape, l'ARN est un triplicata de l'ARN Let-7 recherché, du fait du design de l'insert intégré au plasmide bactérien. L'échantillon subit un clivage à la RNase H à 37°C avec une chimère ADN hybridée à l'ARN d'intérêt (séquence), qui permet de récupérer pour chaque transcrit 3 ARN Let-7 prêts à être analysés en RMN. L'échantillon subit à nouveau une extraction au butanol et une lyophilisation sous vide, avant d'être resuspendu en tampon pour les expériences de RMN (tampon phosphate, sels, pH, 10% D<sub>2</sub>O).

### *Expériences RMN sur les échantillons*

Une fois l'échantillon placé dans le spectromètre, le transfert d'énergie entre la sonde et l'échantillon est optimisé par le *tuning* et le *matching* de la sonde (<sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C et <sup>15</sup>N). Les inhomogénéités du champ magnétique  $\vec{B}_0$  sont ensuite compensés en ajustant les courants dans les bobines de *shim*. La stabilité dans le temps du champ  $\vec{B}_0$  est assurée par la boucle de rétroaction du *lock*. La qualité de l'échantillon est testée par des expériences 1D (<sup>1</sup>H) et 2D (<sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C et <sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N HSQC) après optimisation de la suppression de l'eau. Ensuite les expériences R<sub>1ρ</sub> sont calibrées, les temps de relaxation optimisés et l'intensité et la position des *spins lock* sont choisies pour observer les processus d'échanges sur les sites d'intérêt. La série d'expérience R<sub>1ρ</sub> est réalisée (environ 1 semaine). Les données, qui sont traitées informatiquement par transformée de Fourier et les vitesses de relaxation R<sub>1ρ</sub> sont extraites par modélisation mono-exponentielle de la décroissance du signal au cours des délais de relaxation variables pour un *spin lock* donné. Ces paramètres sont ensuite utilisés pour la modélisation des processus dynamiques de l'échantillon étudié.

## ***Résultats***

### *Préparation du modèle ADN de Let-7*

#### Préparation à petite échelle

Comme présenté en introduction, il est important d'observer si le protocole fonctionne effectivement avant de le mettre en place pour la production d'échantillons à grande échelle, du fait des coûts de production importants. Lors de la mise en place du projet, les étapes d'amplification bactérienne ont été validées au préalable par Landry GAYET. La première étape clé suite à cette amplification est la digestion enzymatique. Nous avons donc vérifié si l'étape de digestion avec SacI/NcoI avait fonctionné par migration sur gel d'agarose 2% (Figure 2). Nous avons conclu de cette figure que nous avons réussi à obtenir une petite quantité d'ADN que nous pouvons utiliser pour la transcription à petite échelle.

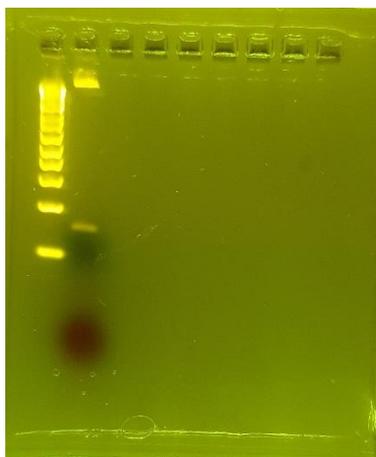


Figure 2 : Résultat de la migration du produit de digestion au couple SacI/NcoI

#### Préparation à grande échelle

Le passage d'une petite échelle de production à la production de quantités d'ADN suffisantes pour son utilisation en RMN pose 2 problèmes. Le premier est celui de la digestion enzymatique, puisque NcoI représente un coût non négligeable pour la production de milligrammes de matériel biologique. Le second est celui de la séparation des deux produits de digestion, la taille des gels classiques imposant une contrainte supplémentaire très forte au processus de production.

Nous avons donc dans un premier temps cherché à optimiser la quantité d'enzymes de restriction nécessaire pour qu'à grande échelle, les coûts de production d'un échantillon d'ADN restent raisonnables. Nous avons donc testé les conditions de digestions présentées dans le tableau suivant :

Tableau 1 : Composition des conditions de digestion, d32 correspond à la solution mère d'enzyme de restriction diluée 32 fois (volumes en  $\mu\text{L}$ )

	1	2	3	4	5 (d32)	6(d32)	7(d32)	8(d32)
Plasmide	27,7	27,7	27,7	27,7	27,7	27,7	27,7	27,7
Buffer 10X	4	4	4	4	4	4	4	4
SacI	0,8	0,4	0,2	0,1	0,8	0,4	0,2	0,1
NcoI	0,8	0,4	0,2	0,1	0,8	0,4	0,2	0,1
H <sub>2</sub> O	6,7	7,5	7,9	8,1	6,7	7,5	7,9	8,1

Le résultat de la digestion sous ces différentes conditions est présenté en Figure 3. Ce gel nous a permis de conclure que même à de faibles concentrations de NcoI, cette enzyme est suffisamment performante pour permettre une digestion satisfaisante du plasmide amplifié. A terme, l'utilisation de NcoI ne deviendra pas un facteur financier limitant pour la production de modèles ADN.

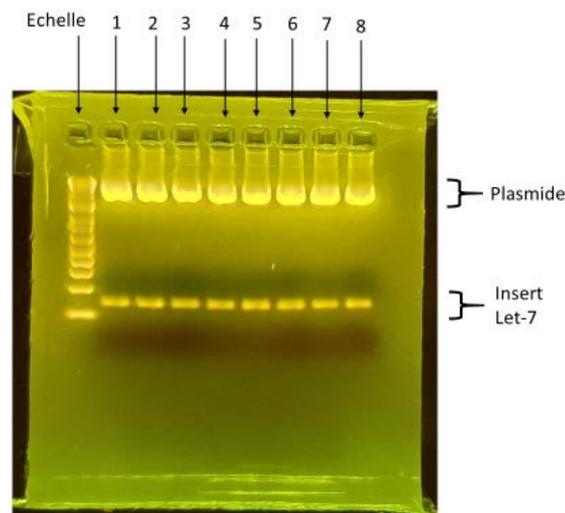
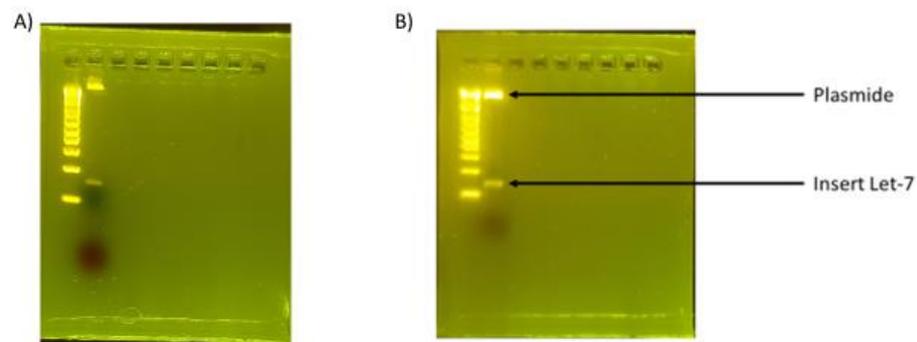


Figure 3 : Gel d'agarose 2% révélant le produit de digestion à 37°C par des concentrations variables de SacI/NcoI présentées dans le Tableau 1. Puit 1 : échelle moléculaire. Puit 2 à 5 : condition 1 à 4. Puit 6 à 9 : condition 5(d32) à 8(d32).

Nous avons ensuite testé l'efficacité de différentes méthodes de séparation pour isoler l'insert Let-7, puisque la méthode de migration sur gel d'agarose n'est pas applicable à la production d'échantillons d'ADN à grande échelle. La première méthode dont nous avons évalué l'efficacité est celle de la séparation par billes magnétiques. Cependant, cette approche ne s'est pas montrée concluante puisque cela n'a pas permis de séparer le plasmide de l'insert, comme montré en Figure 4. Les premiers tests que nous avons pu mettre en place pour la méthode d'ultracentrifugation avec une limite à 100kDa avant la crise sanitaire ne se sont pas non plus révélés concluants (Figure 4), la limite étant probablement trop basse et donc n'incluant pas l'insert. Une voie possible pour contourner ce problème serait de d'augmenter le cutoff du filtre utilisé.



**Figure 4 :** Gel de vérification de l'extraction par taille sur la fraction de l'insert de Let-7 selon A) la méthode d'ultracentrifugation ou B) le kit de billes magnétiques. La présence des 2 bandes indique l'échec de la séparation.

Nous avons donc conclu que la digestion à grande échelle était possible, mais qu'il allait falloir tester des méthodes alternatives pour la séparation des produits de digestion pour avoir un protocole viable pour la production d'échantillons d'ADN utilisables pour une transcription à grande échelle.

### *Préparation des ARN de Let-7*

#### Préparation à petite échelle

Avant de regarder les conditions optimales de transcription à grande échelle, il faut s'assurer que la transcription permet bien de produire l'ARN de Let-7 voulu. C'est pourquoi il

est nécessaire de regarder les conditions optimales de transcription à petite échelle. Nous avons donc testé plusieurs conditions de transcription présentées dans le Tableau 2.

**Tableau 2 :** Composition des solutions de transcription testées (volumes en  $\mu\text{L}$ )

	1	2	3	4
PEG 8000	5	5	5	5
DMSO	5	5	5	5
H <sub>2</sub> O	2	0	0	4
Buffer 10X	2,5	2,5	2,5	2,5
MgCl <sub>2</sub>	2,5	2,5	2,5	2,5
Mix NTP (25 mM de chaque)	4	4	4	2
Modèle ADN	2	2	4	2
T7 polymerase	2	4	2	2

Ces conditions ont pu être testées au laboratoire mais suite au confinement, les résultats n'ont pas pu être analysés pour nous permettre de conclure quant à l'efficacité de chaque condition de transcription.

### *Perspectives*

Avant la mise en place des mesures sanitaires, j'ai pu avoir recours à d'autres techniques mentionnées dans le matériel et méthodes. Je n'ai pas pu réaliser la digestion à la RNase H pour mon échantillon, ni la mise en place d'expérience pour ce dernier. Je n'ai pas eu beaucoup d'occasion d'utilisation des spectromètres, ni de travailler à l'acquisition et l'interprétation de spectres.

Néanmoins, j'ai travaillé avec Sirine NOURI sur les deux HPLC mentionnées, pour l'optimisation de la purification de l'ARN HIV-TAR-1 pour les expériences de RMN, ainsi que l'extraction au butanol et le séchage sous vide de l'échantillon. J'ai aussi pu suivre en interne une partie de la formation pour utiliser en autonomie ces machines.

De plus, les premiers tests d'optimisation de transcription ont été réalisés, mais n'ont pas pu être continués à cause de la fermeture du laboratoire. J'ai aussi eu l'occasion d'assister Loïc SALMON dans la mise en place d'une expérience RMN au spectromètre 1GHz sur un

échantillon d'ARN de transfert. J'ai pu faire les réglages du spectromètre (calibration de température, matching, tuning, lock shim...) ainsi qu'observer la mise en place d'une séquence d'impulsion ( $R_{1\rho}$ ). J'ai donc pu malgré la mise en place du confinement prendre part aux étapes suivant celle où j'ai été stoppé.

Bien que nous ayons pu produire Let-7 à petite échelle, il faudrait encore le produire à grande échelle et réaliser le clivage à la RNase H pour pouvoir l'utiliser en RMN. Le protocole est aussi à répéter pour les différentes cibles présentées en introduction, pour pouvoir observer au spectromètre les interactions potentielles entre Let-7 et ces cibles. Les étapes de production des ARN et les analyses par RMN restent donc encore à faire.

### *Conclusion*

Le contexte sanitaire n'a pas permis d'aller au bout de la démarche, et de produire un échantillon analysable ainsi que de mener des analyses de RMN sur ce dernier. Nous n'avons donc pas pu conclure quant aux interactions existantes entre Let-7 et ses partenaires d'interactions présentées en introduction.

Cependant, notre démarche de production d'échantillons semble être prometteuse en considérant les contraintes imposées par les expériences de RMN. En effet, les premiers résultats obtenus semblent aller dans le sens d'une possibilité de production à grande échelle d'échantillon. Les étapes réalisées ont globalement bien fonctionné et permit d'atteindre un stade avancé de la production. L'objectif initial était de pouvoir étudier ces échantillons par RMN, cela n'ayant pas été possible les mesures RMN ont été présentées dans le rapport bibliographique.

## Références

- BALZEAU, Julien, MENEZES, Miriam R., CAO, Siyu et HAGAN, John P., 2017. The LIN28/let-7 Pathway in Cancer. *Frontiers in Genetics* [en ligne]. 28 mars 2017. Vol. 8. [Consulté le 27 avril 2020]. DOI 10.3389/fgene.2017.00031. Disponible à l'adresse : <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fgene.2017.00031/full>
- BARONTI, Lorenzo, KARLSSON, Hampus, MARUŠIČ, Maja et PETZOLD, Katja, 2018. A guide to large-scale RNA sample preparation. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. mai 2018. Vol. 410, n° 14, pp. 3239-3252. DOI 10.1007/s00216-018-0943-8.
- BOTHE, Jameson R, NIKOLOVA, Evgenia N, EICHHORN, Catherine D, CHUGH, Jeetender, HANSEN, Alexandar L et AL-HASHIMI, Hashim M, 2011. Characterizing RNA dynamics at atomic resolution using solution-state NMR spectroscopy. *Nature Methods*. novembre 2011. Vol. 8, n° 11, pp. 919-931. DOI 10.1038/nmeth.1735.
- FÜRTIG, Boris, RICHTER, Christian, WÖHNERT, Jens et SCHWALBE, Harald, 2003. NMR Spectroscopy of RNA. *ChemBioChem*. 6 octobre 2003. Vol. 4, n° 10, pp. 936-962. DOI 10.1002/cbic.200300700.
- LEE, Yong Sun et DUTTA, Anindya, 2007. The tumor suppressor microRNA let-7 represses the HMGA2 oncogene. *Genes & Development*. 1 mai 2007. Vol. 21, n° 9, pp. 1025-1030. DOI 10.1101/gad.1540407.
- MACFARLANE, Leigh-Ann et R. MURPHY, Paul, 2010. MicroRNA: Biogenesis, Function and Role in Cancer. *Current Genomics*. 1 novembre 2010. Vol. 11, n° 7, pp. 537-561. DOI 10.2174/138920210793175895.
- RANA, Tariq M., 2007. Illuminating the silence: understanding the structure and function of small RNAs. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. janvier 2007. Vol. 8, n° 1, pp. 23-36. DOI 10.1038/nrm2085.
- ROUSH, Sarah et SLACK, Frank J., 2008. The let-7 family of microRNAs. *Trends in Cell Biology*. octobre 2008. Vol. 18, n° 10, pp. 505-516. DOI 10.1016/j.tcb.2008.07.007.
- YIN, Jinlong, KIM, Tae-Hoon, PARK, Nayun, SHIN, Daye, CHOI, Hae In, CHO, Sungchan, PARK, Jong Bae et KIM, Jong Heon, 2016. TRIM71 suppresses tumorigenesis via modulation of Lin28B-let-7-HMGA2 signaling. *Oncotarget*. 29 novembre 2016. Vol. 7, n° 48, pp. 79854-79868. DOI 10.18632/oncotarget.13036.

 agriculture • alimentation • environnement 	Diplôme : Ingénieur Spécialité : Agronome Spécialisation / option : Biologie Moléculaire et Cellulaire Enseignant référent : Sandrine Lagarrigue
Auteur(s) : Maxime Borret  Date de naissance : 24/06/1998	Organisme d'accueil : CRMN Adresse : 5 Rue de la Doua, 69100, Villeurbanne
Nb pages : 17      Annexe(s) : 0	
Année de soutenance : 2020	Maître de stage : Loïc Salmon
Titre français : Etude de la dynamique de Let-7 par RMN très hauts champs  Titre anglais : Let-7 dynamic with extremely high field NMR	
<b>Résumé :</b>  Let-7 est un micro-ARN non codant impliqué dans différents mécanismes cellulaires. Il interagit avec divers partenaires comme HMGA2, TRIM71 ou encore LIN28B, et sa dérégulation est à l'origine de certains cancers. Pour mieux comprendre le fonctionnement de ce micro-ARN, il est important de connaître les modalités d'interaction avec ses partenaires à l'échelle atomique. Pour cela, la résonance magnétique nucléaire ou RMN, représente un outil puissant pour l'étude de la dynamique moléculaire à cette échelle. En effet, cela permet d'observer différents mouvements à des temps allant de la picoseconde à la seconde. L'extraction de paramètres dynamiques issus des spectres permet la modélisation et la caractérisation des interactions existantes entre deux molécules. De la production d'échantillons à la résolution de spectres, nous présentons dans ce mémoire la démarche d'étude de la dynamique de Let-7 ainsi que les premiers résultats obtenus sur sa production pour l'analyse en RMN	
<b>Abstract :</b>  Let-7 is a non-coding micro-RNA involved in various cellular mechanisms. It interacts with other RNAs as HMGA2, TRIM71 or LIN28, and its deregulation implies cancers. In order to understand how this micro-RNA works, it is important to know the interactions between him and its different partners at an atomic scale. For that, nuclear magnetic resonance or NMR represents a powerful tool for molecular dynamic studies. Indeed, it allows us to observe various movements from picoseconds to seconds. Extraction of dynamic parameters from spectra allows us to characterize and describe existing interactions between two molecules. From sample production to spectra resolution, we will present in this dissertation our approach to study Let-7 dynamic and present our first results about its production and its analysis with NMR.	
<b>Mots-clés :</b> Micro-ARN, dynamique, RMN, cancer, modélisation, Let-7  <b>Key Words:</b> Micro-RNA, dynamics, NMR, cancer, modeling, Let-7	

Maxime BORRET

Master 2 Biologie Moléculaire et Cellulaire

Centre de Résonance Magnétique Nucléaire

# Etude de la structure et de la dynamique des ARN par résonance magnétique nucléaire

Résumé : La description de la dynamique des ARN représente un point clé de la compréhension de leur fonctions biologiques. Des phénomènes comme les riboswitchs ou encore les propriétés catalytiques de certains ARN reposent sur les modifications structurelles auxquelles les ARN sont sujets. Pour observer ces mécanismes à l'échelle atomique pour mieux les comprendre et les modéliser, la résonance magnétique nucléaire (RMN) s'est imposée comme une technologie puissante pour observer cette dynamique. En effet, elle permet d'observer un large panel de mouvements, à plusieurs échelles de temps. Les expériences de relaxation de spin permettent d'étudier les mouvements de la picoseconde à la nanoseconde, les expériences de relaxation dispersion les mouvements de la microseconde à la milliseconde, et l'étude des couplages dipolaires résiduels de la picoseconde à la milliseconde. Ce mémoire présente ces différentes méthodes ainsi que leur utilisation en RMN des ARN, en discutant aussi bien la méthode d'analyse que les résultats qu'elles ont permis d'obtenir.

Mots-clés : RMN, ARN, dynamique, relaxation de spin, relaxation-dispersion, couplages dipolaires résiduels



L'information génétique de l'organisme est codée par l'ADN, lui-même transcrit en ARN . Il existe de nombreuses familles d'ARN, qui occupent des postes clés dans la cellule, comme dans la synthèse protéique, la régulation génique ou la transduction de signaux cellulaires. La plupart des propriétés de ces ARN dépendent directement de leur structure, qui n'est pas fixe dans le temps [1] [2]. En effet, les ARN sont sujets à des modifications spontanées de leur structure, à différentes amplitudes (de la rotation de nucléobase au changement de structure secondaire) et à différentes échelles de temps (de la picoseconde à la minute), lié à un paysage énergétique vaste autorisant de nombreux états, et donc possiblement des fonctions différentes (**Figure 1**) [3]. L'étude de cette dynamique complexe suscite l'intérêt de la communauté scientifique depuis plusieurs années, notamment pour l'explication de mécanismes lié à des modulations dans la structure des ARN, et pour appréhender plus précisément les interactions se produisant à l'échelle moléculaire, que ce soit au sein d'une même molécule d'ARN ou entre un ARN et son partenaire. Les avancées récentes des technologies de spectroscopie, notamment sur le plan de la spectroscopie par résonance magnétique (RMN), permettent aujourd'hui d'observer avec précision la dynamique de molécules biologiques, notamment des ARN [3]. L'évolution des séquences d'impulsions, l'augmentation de la force des champs magnétiques et l'amélioration globale des systèmes d'acquisition font de la RMN une méthode puissante pour l'acquisition de données structurales et de dynamique. Cela repose sur l'exploitation de plusieurs méthodes comme la relaxation de spin [4], les couplages dipolaires résiduels [5] ou encore les méthodes de relaxation-dispersion [6]. Dans ce mémoire, nous allons voir comment ces méthodes permettent d'obtenir des informations sur la structure et la dynamique des ARN, les expériences réalisées pour l'acquisition des données, ainsi que les différents paramètres observables. Nous étudierons d'abord la préparation des échantillons pour les expériences RMN avant d'expliquer ce qu'est une expérience RMN, puis l'utilisation de la relaxation, de la relaxation-dispersion, et des couplages dipolaires résiduels.

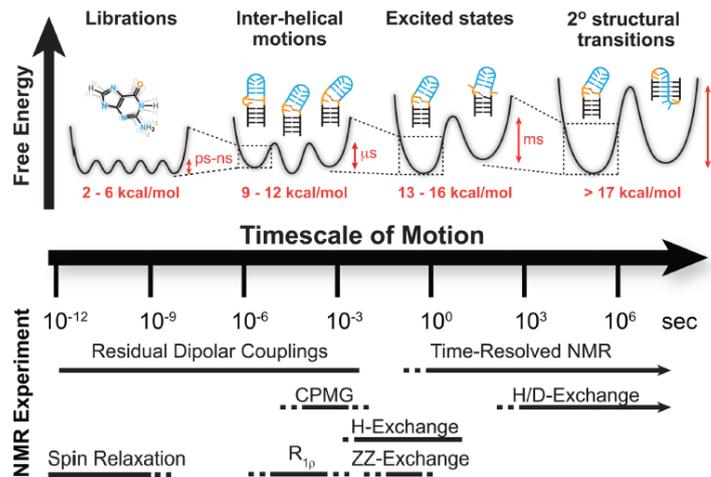


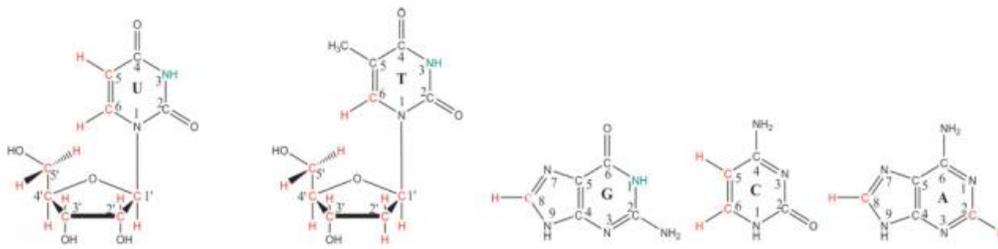
Figure 1 : Phénomènes dynamiques caractéristiques des ARN, leur échelle de temps et les expériences RMN pour les observer, adapté de [3].

### Préparation d'échantillons

La préparation d'échantillons pour une expérience RMN est une étape très importante pour le bon déroulement de cette dernière. En effet, les noyaux pouvant être observés en RMN pour les ARN sont le  $^1\text{H}$ , le  $^{13}\text{C}$ , le  $^{15}\text{N}$  et le  $^{31}\text{P}$ . Ces atomes possèdent en effet un spin non nul ce qui permet sous un champ magnétique suffisamment intense de lever la dégénérescence des niveaux d'énergie, et ainsi permettre le phénomène de résonance magnétique [7]. Néanmoins le  $^{13}\text{C}$  et le  $^{15}\text{N}$  n'ont des abondances relatives très faibles (respectivement 1% et 0.4%) et un enrichissement isotopique de ces noyaux est en général nécessaire. La stratégie est donc de choisir lors de la biosynthèse de l'ARN d'intérêt quel site il est intéressant d'observer : type d'atome, position... (**Figure 2**). Une fois la stratégie d'observation sélectionnée, il faut biosynthétiser l'ARN marqué.

La procédure classique est une transcription *in vitro* par la T7 polymérase à partir d'une séquence d'ADN modèle, en utilisant des nucléotides marqués  $^{13}\text{C}$  et  $^{15}\text{N}$ , permettant d'observer le phénomène de RMN [8]. Il est aussi possible d'obtenir des ARN par synthèse chimique grâce à un synthétiseur d'oligonucléotides [9]. Une fois le produit de transcription obtenu, il convient de le purifier pour permettre les études RMN [8]. Pour cela, on utilise une

technique de chromatographie, la *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC), plus particulièrement l'HPLC de partage en conditions dénaturantes pour ne récupérer que le



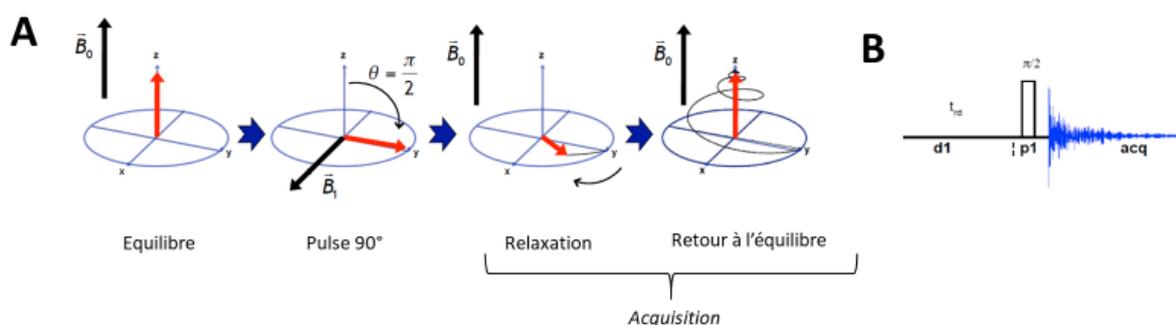
**Figure 2 :** Liste des sondes carbone, proton et azote classiquement exploitées en RMN des acides nucléiques, adapté de [4].

transcrit d'intérêt, et éliminer tous les autres produits et réactifs du mix de transcription. Cette première phase de purification effectuée, il faut remettre l'ARN en condition native, l'extraire par extraction au butanol, le sécher et le resuspendre en tampon RMN. Une fois dans le tampon, l'échantillon est placé en tube RMN Shigemi (pour minimiser le volume d'échantillon nécessaire), et est prêt à être analysé [8]. Ce protocole est le plus utilisé actuellement pour la préparation massive d'échantillons d'ARN pour l'analyse par RMN.

### **L'expérience RMN**

Dans une expérience simple de RMN, les noyaux sont exposés à un champ noté  $\vec{B}_0$ , dont la valeur est typiquement de plusieurs Teslas, par convention définissant l'axe z [10]. Après avoir atteint un état d'équilibre dans ce champ, il apparaît alors une aimantation dans la population de spins appelée aimantation globale et représentée par le vecteur  $\vec{M}$  [10], résultant de la levée de la dégénérescence des niveaux d'énergie (effet Zeeman [7]). Les moments magnétiques de spin, qui collectivement créent l'aimantation globale, précessent autour de  $\vec{B}_0$  à une fréquence caractéristique appelée fréquence de Larmor. La fréquence de résonance d'un noyaux au sein d'un édifice moléculaire sera de plus modulée par son environnement chimique local, appelé déplacement chimique. Actuellement les spectromètres utilisés pour l'étude détaillée des ARN correspondent à des fréquences de Larmor d'environ 500MHz à 1GHz. Cet équilibre est par la suite perturbé par un champ

radiofréquence (RF), noté  $\vec{B}_1$ , orthogonal et nettement moins intense que  $\vec{B}_0$  [7]. La conséquence de cette exposition à ce champ radiofréquence est un basculement de l'aimantation globale dans le plan (x,y). Suite à cela, on coupe le champ  $\vec{B}_1$ , et on laisse revenir l'aimantation globale à l'équilibre initial selon  $\vec{B}_0$ . La précession des spins autour de  $\vec{B}_0$  au cours de ce retour à l'équilibre, appelée relaxation est décrit par les équations de Bloch [10]. La relaxation est composée de deux temps caractéristiques :  $T_1$  ou temps de relaxation spin-réseau, et  $T_2$  ou temps de relaxation spin-spin, respectivement associés aux taux de décroissance caractéristiques  $R_1 = 1/T_1$  et  $R_2 = 1/T_2$  [11], (**Figure 3**). La relaxation spin-réseau correspond au retour à l'équilibre thermique des noyaux et à la restauration de l'aimantation globale dans l'axe z [10], et conditionne donc le temps de retour à l'équilibre du système. La relaxation spin-spin correspond quant à elle à la perte d'aimantation dans le plan (x,y), due à la perte de cohérence entre spins, induite par le fait que les spins ne précessent pas autour de z à la même vitesse à cause des champs magnétiques locaux dans la molécule. C'est durant ce temps que se fait l'acquisition du signal RF émit par les spins, appelé *Free Induction Decay*, et qui après transformation de Fourier donnera le spectre en fréquences exploitable, dont la largeur de raies est conditionnée par  $T_2$  et la position par le déplacement chimique [7]. Une expérience RMN est donc constituée de blocs d'impulsions et de délais les séparant avec des propriétés physiques spécifiques, dont les différents assemblages donnent accès à des informations structurales et dynamiques propres à l'expérience réalisée [12]. Pour plus de clarté, ici et par la suite les séquences d'impulsion décrites correspondent à des versions simplifiées des expériences réellement réalisées.



**Figure 3 :** Représentation graphique de l'expérience RMN 1D. (A) Déroulé de l'expérience 1D dans un modèle vectoriel : l'aimantation globale des représentée en rouge. (B) Séquence d'impulsion d'une expérience RMN 1D: délai (d1), pulse (p1) et acquisition (acq), adapté de

[13]

## ***Relaxation de spin***

Ces phénomènes de relaxation peuvent être expliqués par différents mécanismes : les couplages dipolaires (interaction magnétique dipôle-dipôle agissant entre paires de spins), l'anisotropie de déplacement chimique CSA (le déplacement chimiquement dépendant de l'orientation de la molécule par rapport au champ  $\vec{B}0$ ) et l'effet Overhauser nucléaire ou nOe (Transfert de polarisation entre 2 spins à travers l'espace à une distance maximale de 5Å [14]). Il est important de noter qu'en RMN des solutions, le mouvement moléculaire moyenne à zéro les contributions directes de l'interaction dipolaire et du CSA, ces derniers n'apparaissant que dans les processus de relaxation (voir ci-dessous). L'ensemble de ces phénomènes responsables de la relaxation de spin, peuvent être quantifiés et interprétés pour obtenir des informations structurales et des modèles dynamiques de petites molécules comme les ARN à des échelles de temps allant de la picoseconde à la nanoseconde [15]. Les premiers paramètres mesurés sont le  $T_1$ , le  $T_2$  et le nOe hétéronucléaire, qui est l'effet NOE existant entre deux noyaux différents (typiquement l'effet du  $^1\text{H}$  sur un  $^{13}\text{C}$  ou  $^{15}\text{N}$ ). On mesure le  $T_1$  par une séquence d'impulsions appelée *Inversion Recovery*, composée de 2 pulses (un 180 et un 90) séparés d'un temps d'évolution  $\tau$  variable, que l'on fait évoluer pour encoder l'effet de la relaxation  $T_1$  durant cette période[11]. Le  $T_2$  est quant à lui mesuré par une séquence appelée CPMG (séquence de Carr-Purcell-Meiboom-Gill), composée d'un pulse 90°, puis d'un train d'échos de spin à 180°[11], chaque pulse séparé d'un temps  $\tau$  caractéristique. On observe ensuite la décroissance de l'intensité du signal, à laquelle on fait correspondre l'équation suivante :  $M_{x,y} = M_0 e^{-\tau/T_2}$ , qui permet d'obtenir le  $T_2$ . Quant au nOe hétéronucléaire, on le mesure en regardant l'effet que la saturation d'un  $^1\text{H}$  induit sur un  $^{13}\text{C}$  ou un  $^{15}\text{N}$  voisin[16]. Le nOe se mesure comme le rapport des intensités entre 2 expériences opposant une condition où on sature le proton, et une condition où on ne le sature pas.

On utilise dans un premier temps les valeurs des  $T_1$  et  $T_2$  pour chaque résidu pour déterminer le temps de corrélation rotationnel, noté  $\tau_c$  [17], correspondant au temps mit par la molécule pour pivoter d'1 radian. Ce temps représente le mouvement rotationnel global de la molécule en solution, et est identique pour toute la molécule. On définit ensuite un temps de corrélation interne  $\tau_i$  pour chaque résidu de la molécule, que l'on considère décorrélié du temps de réorientation global, ainsi qu'un paramètre d'ordre  $S^2$ , décrivant la réorientation angulaire d'un vecteur défini par un résidu [15]. Ces paramètre sont utilisés dans la fonction

de densité spectrale suivante notée  $J(\omega)$  avec l'approche de Lipari-Szabo telle que  $J(\omega) = \frac{2}{5} (S^2 \frac{\tau_c}{1+\omega^2\tau_c^2} + (1 - S^2) \frac{\tau_i}{1+\omega^2\tau_i^2})$  [15]. On détermine la fonction de densité spectrale pour chaque résidu en faisant correspondre les variables  $S^2$  et  $\tau_i$  au mieux avec les valeurs de  $T_1$ ,  $T_2$  et  $nOe$  obtenues expérimentalement (elles même exprimables comme une combinaison linéaire de la fonction de densité spectrale échantillonnée à différentes fréquences). L'exploitation de cette fonction de densité spectrale permet de décrire les mouvements à l'échelle locale pour chaque résidu, et la cartographie de ces fonctions permet de décrire la dynamique de la molécule étudiée [18]. L'équipe de Dayie et al. ont réussi grâce à la mesure de ces paramètres par relaxation du  $^{13}C$  à décrire les mouvements internes de l'ARN TAR du virus HIV-2 en utilisant une approche *free model* [19].

On peut aussi caractériser l'effet NOE homonucléaire, permettant notamment de mesurer des distances entre noyaux, et donne des informations précieuses sur la géométrie et la structure locale [3]. Pour le mesurer, on réalise une expérience appelée *Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy* (NOESY) 2D, dont la séquence d'impulsion est composée de 3 impulsions  $90^\circ$ , les deux premières séparées d'un temps d'évolution  $t_1$  variable contribuant à la création de la deuxième dimension, et les pulses 2 et 3 séparés d'un temps invariant  $\tau_m$ , dont la valeur est sélectionnée pour un optimum de transfert de polarisation entre les noyaux étudiés [20]. Le résultat est un spectre 2D présentant des corrélations entre pics, et permet d'attribuer les signaux existants, notamment pour les protons imino des bases d'acide nucléique, et de quantifier la distance séparant les noyaux observés. Ce type expérience a aussi notamment servi au groupe de B.R Reid et al. pour élucider la structure secondaire d'un petit ARNt [21], et au groupe de M.J Kime et al. d'étudier les modalités d'interaction entre un ARNr 5S et la protéine ribosomale L25 [14]. Les expériences de relaxation représentent donc des outils puissants pour décrire les mouvements moléculaires à l'échelle locale ou globale et à des échelles de temps rapides (ps-ns), donnant aussi des informations précieuses pour l'élucidation de structures d'ARN.

### ***Relaxation-dispersion***

Les expériences de relaxation-dispersion (RD) en RMN utilisent une approche différente des expériences de relaxation de spin, permettant de caractériser la dynamique moléculaire de la microseconde à la milliseconde [22]. Ces expériences reposent sur

l'existence d'un échange chimique entre différents états énergétiques d'une même molécule, impliquant plusieurs populations dont une très majoritaire devant l'autre [7]. On distingue deux états : l'état dit fondamental (EF), qui correspond à l'agencement et à la structure classique de l'ARN, et un état dit excité (EE), qui correspond à un état transitoire impliquant une structure et un agencement structural différent de l'ARN [23]. Cette transition d'un EE à un EF et inversement, peut se faire spontanément sans mécanisme enzymatique auxiliaire. Ces états excités, le plus souvent invisibles sur des expériences classiques du fait de leur proportion très faible et de leur durée de vie limitée, représentent l'objet des études par relaxation-dispersion [24]. La structure étant fortement liée à la fonction d'un ARN, ces états structurels transitoires instables représentent une source d'information pour l'explication de mécanismes moléculaires.

Le principal paramètre d'intérêt pour les expériences de relaxation-dispersion est le déplacement chimique. En effet, ce dernier dépend directement de l'environnement électronique du noyau, qui influence le champ magnétique effectif ressenti par ce dernier. Cela rend donc la valeur du déplacement chimique sensible aux variations structurelles et aux variations de liaison, qui vont par conséquent modifier l'environnement électronique observé [25]. De ce fait, on peut en théorie observer sur le spectre un même noyau qui va résonner à deux fréquences différentes : la fréquence de l'état fondamental  $\omega_{EF}$ , et la fréquence de l'état excité  $\omega_{EE}$ , dont l'écart  $\Delta\omega$  peut être comparé à la constante de vitesse d'échange  $k_{ex}$  entre les deux états [25]. On caractérise le régime d'échange selon le critère suivant : échange lent pour  $k_{ex} \ll \Delta\omega$ , échange intermédiaire pour  $k_{ex} \approx \Delta\omega$ , et échange rapide pour  $k_{ex} \gg \Delta\omega$  [25]. Cependant, lorsqu'il y a échange chimique, les noyaux vont exister un certain temps dans l'un ou l'autre de ces états, ce qui va causer une désynchronisation du mouvement de précession autour de  $\vec{B}_0$ . La conséquence de cet effet est l'apparition d'un terme supplémentaire dans la relaxation transversale appelé  $R_{ex}$ , qui est la contribution du phénomène d'échange à la détermination de  $R_2$  [26]. Un des objectifs des expériences de RD consiste à évaluer le  $R_{ex}$ , le  $k_{ex}$ , de même que les fréquences de résonances  $\omega_{EF}$  et  $\omega_{EE}$  ainsi que les populations des deux états  $p_{EF}$  et  $p_{EE}$  [3].

Pour cela, on peut effectuer une mesure de relaxation dans le référentiel tournant ou  $R_{1\rho}$  [25]. Cela consiste en l'application d'un champ RF continu de fréquence variable appelé champ de *spin-lock*, ayant pour but de bloquer l'aimantation  $M$  dans une orientation précise

sans empêcher les phénomènes de relaxation. On observe ces processus de relaxation sous l'effet de spin lock d'intensité variable ( $\omega_1$ ). On fait ensuite varier soit la fréquence d'offset  $\Omega$  du spinlock par rapport à la fréquence du signal observé. Lorsque  $\Omega=0$ , le spin lock est appliqué à la fréquence du signal observé, on parle de  $R_{1\rho}$  on-résonance. Si le spin lock est appliqué à une autre fréquence,  $\Omega$  non nul, on parle de  $R_{1\rho}$  off-résonance. La variation de ( $\Omega, \omega_1$ ) va permettre d'observer sous plusieurs angles la modulation du signal principal par l'effet de l'état excité [25].

Pour mesurer le  $R_{1\rho}$ , on utilise une séquence d'impulsion composée d'un bloc de transfert de polarisation du proton au carbone/azote, d'un bloc de relaxation de durée variable  $T_{relax}$  où les spins évoluent sous contrainte du *spin-lock*, et d'un bloc de retour de polarisation du carbone/azote vers le proton, avant mesure ensuite le signal du proton, et cela pour chaque couple ( $\Omega, \omega_1$ ) choisi [22]. On construit ensuite le spectre 2D avec la variation de  $T_{relax}$  en deuxième dimension, et on fait correspondre l'intensité des pics avec  $T_{relax}$  selon l'équation  $I = I_0 e^{-R_{1\rho} T_{relax}}$  pour obtenir la valeur du  $R_{1\rho}$  [27]. On utilise ensuite cette donnée dans un modèle d'équation de Laguerre pour extraire  $k_{ex}$ ,  $\omega_{EF}$  et  $\omega_{EE}$  ainsi que  $\rho_{EF}$  et  $\rho_{EE}$ . On représente en général le résultat sous forme d'une courbe opposant  $R_2 + R_{ex}$  avec les différents couples ( $\Omega, \omega_1$ ) choisis, (**Figure 4**, issue de l'équipe de Xue et al [26]). Les déplacements chimiques obtenus pour l'état excité peuvent être utilisés pour obtenir des informations structurelles, en utilisant par exemple Mfold qui ont notamment permis à Dethoff et al. de caractériser la structure d'un état excité de l'ARN du HIV-TAR1 en montrant l'existence d'une boucle plus compacte sous forme excitée [24]. D'autres expériences existent comme la CPMG qui est semblable à l'expérience  $R_{1\rho}$ , sauf que l'on remplace dans la séquence d'impulsions le bloc de *spin-lock* par un bloc CPMG avec des pulses  $90^\circ$  répétés séparés d'un temps  $\tau_{CPMG}$  variable associé à la fréquence  $\nu_{CPMG}$ , et on construit un graphique de  $R_2$  en fonction de  $\nu_{CPMG}$  [28]. Cette méthode a notamment servi au groupe de K.Kloiber et al. de caractériser la structure d'états excités d'ARNs bistables par CPMG [29]. Les expériences de relaxation-dispersion permettent donc de décrire la dynamique d'échange des ARN, se produisant de la  $\mu s$  à la  $ms$ , complémentaire aux mouvements de la  $ps$  à la  $ns$  décrits par les expériences de relaxation. Cependant, on observe une zone dans l'échelle des temps des mouvements, non sondée par la relaxation et la relaxation-dispersion, qui se font en milieu isotrope. Pour décrire

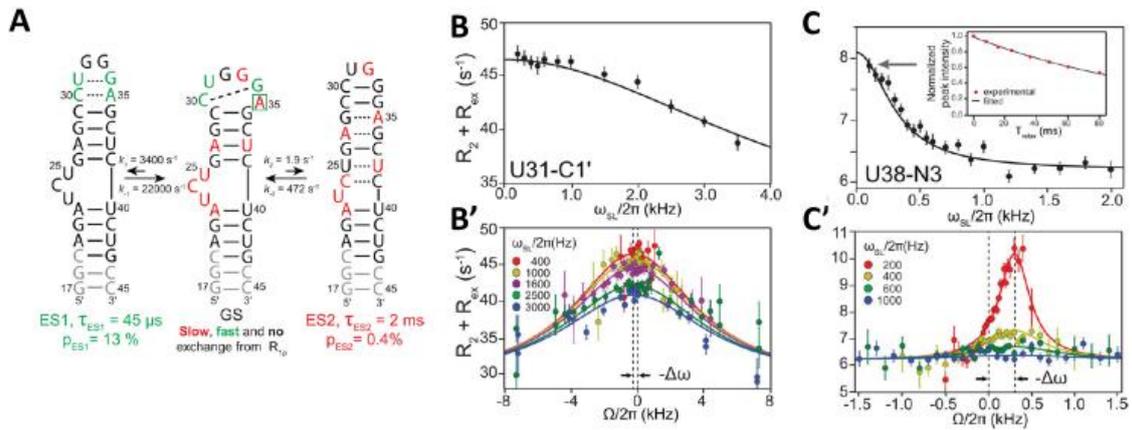


Figure 4 : (A) Représentation du phénomène d'échange de l'ARN HIV-1 TAR entre un état stable et deux états excités. (B) Résultat pour le résidu U31 sur le C1' du  $R_{1\rho}$  on-résonance et (B') off-résonance, montrant un échange rapide entre l'état stable et l'état excité ES1. (C) Résultat pour le résidu U38 sur le N3 on-résonance et (C') off-résonance, montrant un échange lent entre l'état stable et l'état excité ES2, adapté de [26]

la dynamique se produisant à cette échelle de temps manquante, on utilise les couplages dipolaires résiduels.

### Couplages dipolaires résiduels

Comme présenté dans les phénomènes de relaxation, les couplages dipolaires sont normalement moyennés à 0 en solution du fait des mouvements des molécules, sans empêcher leur effet sur la relaxation [7]. Cependant, on peut réintroduire artificiellement ces couplages en utilisant un milieu anisotrope comme des cristaux liquides. En effet, le couplage dipolaire est un phénomène anisotrope, c'est-à-dire qu'il dépend de l'orientation des molécules. En utilisant un milieu induisant un alignement partiel des molécules, on réintroduit ainsi les couplages dipolaires, appelés dans ce contexte couplages dipolaires résiduels (RDC), contenant des informations structurales de dynamiques précieuses. La mesure de RDC permet d'ajouter des informations au nOe mesurés, puisque ces derniers bien que pouvant évaluer la distance exacte entre 2 noyaux, ne permettent pas de déterminer l'orientation d'un noyau par rapport à un autre [30].

Expérimentalement, on mesure principalement les RDC des liaisons  $^1H$ - $^{13}C$  et  $^1H$ - $^{15}N$  pour des raisons pratiques [31]. On effectue des mesures sur ces liaisons par HSQC [16] non découplée en milieu non isotrope et dans plusieurs milieux isotropes différents, pour faire

varier les orientations des molécules et des vecteurs internucléaires étudiés [30]. On regarde ensuite sur le spectre les différences de couplage entre le spectre isotrope et les spectres des milieux anisotropes, ce qui permet par différence de mesurer la valeur des RDC. Ces valeurs sont ensuite associées à un tenseur d'alignement  $A$  ( $A = A_{xx}, A_{yy}, A_{zz}$ ) pour chaque milieu utilisé, ainsi qu'un paramètre d'ordre  $S^2_{\text{RDC}}$  propre à chaque milieu [31]. Ces données peuvent ensuite être utilisées dans un modèle de résolution atomique pour déterminer les angles exacts d'inclinaison du vecteur d'orientation de liaison, permettant d'obtenir ainsi l'orientation du vecteur de liaison dans la structure moléculaire mais aussi son  $S^2_{\text{RDC}}$  déterminant sa dynamique. Ces méthodes ont permis notamment à L. Salmon et al. de développer à partir de données de RDC un modèle avec résolution atomique de l'ARN HIV-1 TAR [32]. Les RDC représentent donc un outil très pratique d'étude de structure et de dynamique à faible échelle de temps (ps-ms).

### ***Conclusion***

La dynamique des ARN est un domaine intimement lié à la fonction biologique de ces derniers. Le phénomène de riboswitch, où la conformation de l'ARN conditionne la transmission de signaux cellulaires, l'effet catalytique des ARNr conditionné par un changement de conformation lors de l'interaction avec le ligand, ou encore l'assemblage des ribonucléoprotéines comme le RISC rendu possible par la flexibilité des molécules d'acide nucléique sont impliqués dans de nombreux mécanismes biologiques comme le phénomène d'interférence ARN ou encore leur repliement, indispensable à leur fonction [1].

La RMN rend possible la caractérisation de la dynamique globale ainsi que locale des ARN, nécessaire à la compréhension des mécanismes biologiques sous-jacent. Sa capacité à explorer les phénomènes dynamiques se produisant à des échelles de temps variés, de la ps à la ns pour la relaxation, de la ps à la ms pour les RDC, de la  $\mu\text{s}$  à la ms pour la relaxation-dispersion, et au-delà de la seconde pour des technologies comme la RMN en temps réel [33].

Bien que moins développée que la RMN des protéines, la RMN des ARN poursuit son évolution et représente une technologie puissante et en plein essor pour la description de la dynamique et de la structure de ces derniers.

## **Bibliographie**

- [1] H. M. Al-Hashimi et N. G. Walter, « RNA dynamics: it is about time », *Current Opinion in Structural Biology*, vol. 18, n° 3, p. 321-329, juin 2008, doi: 10.1016/j.sbi.2008.04.004.
- [2] D. E. Draper, « A guide to ions and RNA structure », *RNA*, vol. 10, n° 3, p. 335-343, mars 2004, doi: 10.1261/rna.5205404.
- [3] J. R. Bothe, E. N. Nikolova, C. D. Eichhorn, J. Chugh, A. L. Hansen, et H. M. Al-Hashimi, « Characterizing RNA dynamics at atomic resolution using solution-state NMR spectroscopy », *Nature Methods*, vol. 8, n° 11, p. 919-931, nov. 2011, doi: 10.1038/nmeth.1735.
- [4] Z. Shajani et G. Varani, « NMR studies of dynamics in RNA and DNA by <sup>13</sup>C relaxation », *Biopolymers*, vol. 86, n° 5-6, p. 348-359, août 2007, doi: 10.1002/bip.20650.
- [5] M. Getz, X. Sun, A. Casiano-Negrone, Q. Zhang, et H. M. Al-Hashimi, « Review NMR studies of RNA dynamics and structural plasticity using NMR residual dipolar couplings », *Biopolymers*, vol. 86, n° 5-6, p. 384-402, août 2007, doi: 10.1002/bip.20765.
- [6] P. Neudecker, P. Lundström, et L. E. Kay, « Relaxation Dispersion NMR Spectroscopy as a Tool for Detailed Studies of Protein Folding », *Biophysical Journal*, vol. 96, n° 6, p. 2045-2054, mars 2009, doi: 10.1016/j.bpj.2008.12.3907.
- [7] M. H. Levitt, « Spin Dynamics Basics of Nuclear Magnetic Resonance », p. 752.
- [8] L. Baronti, H. Karlsson, M. Marušič, et K. Petzold, « A guide to large-scale RNA sample preparation », *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, vol. 410, n° 14, p. 3239-3252, mai 2018, doi: 10.1007/s00216-018-0943-8.
- [9] V. Amarnath et A. D. Broom, « Chemical synthesis of oligonucleotides », *Chem. Rev.*, vol. 77, n° 2, p. 183-217, avr. 1977, doi: 10.1021/cr60306a002.
- [10] G. S. Rule et T. K. Hitchens, *Fundamentals of protein NMR spectroscopy*. Dordrecht: Springer, 2006.
- [11] C. Henoumont, S. Laurent, et L. Vander Elst, « How to perform accurate and reliable measurements of longitudinal and transverse relaxation times of MRI contrast media in aqueous solutions », *Contrast Media & Molecular Imaging*, vol. 4, n° 6, p. 312-321, nov. 2009, doi: 10.1002/cmim.294.
- [12] J. Keeler, « The Basic Building Blocks of NMR Pulse Sequences », p. 16.
- [13] « coursL3\_2014\_RMN\_ENS.pdf ».
- [14] M. J. Kime et P. B. Moore, « Nuclear Overhauser experiments at 500 MHz on the downfield proton spectra of 5S ribonucleic acid and its complex with ribosomal protein L25 », *Biochemistry*, vol. 22, n° 11, p. 2622-2629, mai 1983, doi: 10.1021/bi00280a005.
- [15] M. Blackledge, « NMR Relaxation and Molecular Dynamics », p. 100, 2008.
- [16] P. K. Mandal et A. Majumdar, « A comprehensive discussion of HSQC and HMQC pulse sequences », *Concepts in Magnetic Resonance*, vol. 20A, n° 1, p. 1-23, janv. 2004, doi: 10.1002/cmr.a.10095.
- [17] D. Lee, C. Hilty, G. Wider, et K. Wüthrich, « Effective rotational correlation times of proteins from NMR relaxation interference », *Journal of Magnetic Resonance*, vol. 178, n° 1, p. 72-76, janv. 2006, doi: 10.1016/j.jmr.2005.08.014.
- [18] G. R. Thudupathy et R. B. Hill, « Applications of NMR Spin Relaxation Methods for Measuring Biological Motions », in *Methods in Enzymology*, vol. 384, Elsevier, 2004, p. 243-264.
- [19] K. T. Dayie, A. S. Brodsky, et J. R. Williamson, « Base flexibility in HIV-2 TAR RNA mapped by solution <sup>15</sup>N, <sup>13</sup>C NMR relaxation », *Journal of Molecular Biology*, vol. 317, n° 2, p. 263-278, mars 2002, doi: 10.1006/jmbi.2001.5424.
- [20] M. P. Latham, D. J. Brown, S. A. McCallum, et A. Pardi, « NMR Methods for Studying the Structure and Dynamics of RNA », *ChemBioChem*, vol. 6, n° 9, p. 1492-1505, sept. 2005, doi: 10.1002/cbic.200500123.
- [21] B. R. Reid, N. S. Ribeiro, L. McCollum, J. Abbate, et R. E. Hurd, « High-resolution nuclear magnetic resonance determination of transfer RNA tertiary base pairs in solution. 1. Species

- containing a small variable loop », *Biochemistry*, vol. 16, n° 10, p. 2086-2094, mai 1977, doi: 10.1021/bi00629a006.
- [22] A. L. Hansen, E. N. Nikolova, A. Casiano-Negroni, et H. M. Al-Hashimi, « Extending the Range of Microsecond-to-Millisecond Chemical Exchange Detected in Labeled and Unlabeled Nucleic Acids by Selective Carbon R<sub>1ρ</sub> NMR Spectroscopy », *Journal of the American Chemical Society*, vol. 131, n° 11, p. 3818-3819, mars 2009, doi: 10.1021/ja8091399.
- [23] B. Fürtig, C. Richter, J. Wöhnert, et H. Schwalbe, « NMR Spectroscopy of RNA », *ChemBioChem*, vol. 4, n° 10, p. 936-962, oct. 2003, doi: 10.1002/cbic.200300700.
- [24] E. A. Dethoff, K. Petzold, J. Chugh, A. Casiano-Negroni, et H. M. Al-Hashimi, « Visualizing transient low-populated structures of RNA », *Nature*, vol. 491, n° 7426, p. 724-728, nov. 2012, doi: 10.1038/nature11498.
- [25] A. Rangadurai, E. S. Szymaski, I. J. Kimsey, H. Shi, et H. M. Al-Hashimi, « Characterizing micro-to-millisecond chemical exchange in nucleic acids using off-resonance R<sub>1ρ</sub> relaxation dispersion », *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy*, vol. 112-113, p. 55-102, juin 2019, doi: 10.1016/j.pnmrs.2019.05.002.
- [26] Y. Xue *et al.*, « Characterizing RNA Excited States Using NMR Relaxation Dispersion », in *Methods in Enzymology*, vol. 558, Elsevier, 2015, p. 39-73.
- [27] D. F. Hansen, P. Vallurupalli, et L. E. Kay, « An Improved <sup>15</sup>N Relaxation Dispersion Experiment for the Measurement of Millisecond Time-Scale Dynamics in Proteins<sup>†</sup> », *The Journal of Physical Chemistry B*, vol. 112, n° 19, p. 5898-5904, mai 2008, doi: 10.1021/jp074793o.
- [28] P. Vallurupalli, D. F. Hansen, P. Lundström, et L. E. Kay, « CPMG relaxation dispersion NMR experiments measuring glycine 1H $\alpha$  and <sup>13</sup>C $\alpha$  chemical shifts in the 'invisible' excited states of proteins », *Journal of Biomolecular NMR*, vol. 45, n° 1-2, p. 45-55, sept. 2009, doi: 10.1007/s10858-009-9310-6.
- [29] K. Kloiber, R. Spitzer, M. Tollinger, R. Konrat, et C. Kreutz, « Probing RNA dynamics via longitudinal exchange and CPMG relaxation dispersion NMR spectroscopy using a sensitive <sup>13</sup>C-methyl label », *Nucleic Acids Research*, vol. 39, n° 10, p. 4340-4351, mai 2011, doi: 10.1093/nar/gkq1361.
- [30] J. Marchant, A. Bax, et M. F. Summers, « Accurate Measurement of Residual Dipolar Couplings in Large RNAs by Variable Flip Angle NMR », *Journal of the American Chemical Society*, vol. 140, n° 22, p. 6978-6983, juin 2018, doi: 10.1021/jacs.8b03298.
- [31] M. P. Latham et A. Pardi, « Measurement of imino 1H–1H residual dipolar couplings in RNA », *Journal of Biomolecular NMR*, vol. 43, n° 2, p. 121-129, févr. 2009, doi: 10.1007/s10858-008-9293-8.
- [32] L. Salmon, G. Bascom, I. Andricioaei, et H. M. Al-Hashimi, « A General Method for Constructing Atomic-Resolution RNA Ensembles using NMR Residual Dipolar Couplings: The Basis for Interhelical Motions Revealed », *Journal of the American Chemical Society*, vol. 135, n° 14, p. 5457-5466, avr. 2013, doi: 10.1021/ja400920w.
- [33] M.-K. Lee, M. Gal, L. Frydman, et G. Varani, « Real-time multidimensional NMR follows RNA folding with second resolution », *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 107, n° 20, p. 9192-9197, mai 2010, doi: 10.1073/pnas.1001195107.