

ÉCOLE DOCTORALE SCIENCES DE LA VIE

IGBMC UMR 7104

THÈSE présentée par :

Justine VIÉVILLE

soutenue le : **14 mars 2014**

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'Université de Strasbourg**

Discipline/ Spécialité : Sciences de la vie et de la Santé / Aspects Moléculaires et
Cellulaires de la Biologie

**Etudes d'interactions moléculaires par
RMN dans les systèmes complexes**

**Utilisation de la technologie HR-MAS pour
l'étude de l'interaction protéine ligand**

THÈSE dirigée par :

M DELSUC Marc-André

Docteur, Université de Strasbourg

RAPPORTEURS :

Mme VAN HEIJENOORT Carine

M VIEL Stéphane

M KIEFFER Bruno

Directeur de Recherches, Université d'Orsay, Paris XI

Maître de Conférences, Université Aix-Marseille

Professeur, Université de Strasbourg

AUTRE MEMBRE DU JURY :

M PIOTTO Martial

Docteur, Bruker Biospin

INVITE D'HONNEUR :

M STARCK Jean-Philippe

Docteur, NMRTEC

ÉCOLE DOCTORALE SCIENCES DE LA VIE

IGBMC UMR 7104

THÈSE présentée par :

Justine VIÉVILLE

soutenue le : **14 mars 2014**

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'Université de Strasbourg**

Discipline/ Spécialité : Sciences de la vie et de la Santé / Aspects Moléculaires et
Cellulaires de la Biologie

**Etudes d'interactions moléculaires par
RMN dans les systèmes complexes**

**Utilisation de la technologie HR-MAS pour
l'étude de l'interaction protéine ligand**

THÈSE dirigée par :

M DELSUC Marc-André

Docteur, Université de Strasbourg

RAPPORTEURS :

Mme VAN HEIJENOORT Carine

M VIEL Stéphane

M KIEFFER Bruno

Directeur de Recherches, Université d'Orsay, Paris XI

Maître de Conférences, Université Aix-Marseille

Professeur, Université de Strasbourg

AUTRE MEMBRE DU JURY :

M PIOTTO Martial

Docteur, Bruker Biospin

INVITE D'HONNEUR :

M STARCK Jean-Philippe

Docteur, NMRTEC

Remerciements

Ce travail de thèse a été réalisé au sein de l'entreprise NMRTEC et du laboratoire de RMN biomoléculaire de l'IGBMC sous la direction de Marc-André Delsuc.

Pour débiter ces remerciements, je tiens à remercier chaleureusement Marc-André pour la confiance qu'il m'a accordée en me laissant porter ce projet. C'est avant tout grâce à lui que ma thèse a été rendue possible, je le remercie pour le temps qu'il a passé avec moi, pour ses conseils toujours avisés et pour sa bienveillance. Je salue les discussions enrichissantes que nous avons pu avoir, et je le remercie du soutien sans faille qu'il m'a apporté pendant toute cette période.

Je souhaite ensuite remercier Jean-Philippe Starck, CEO de NMRTEC qui m'a accueillie au sein de son entreprise et m'a permis d'utiliser ses spectromètres aussi bien HR-MAS que solide.

Je remercie également le professeur Bruno Kieffer, chef d'équipe du laboratoire de RMN biomoléculaire de l'IGBMC, pour m'avoir apporté son aide lorsque j'en avais besoin sur les spectromètres. Pour ses explications sur les séquences d'impulsion et pour les cours de RMN conjointement menés avec Marc-André. Merci à lui de s'être rendu disponible lorsque j'en avais besoin.

Je remercie les membres du Jury, Carine Van Heijenoort, Stéphane Viel et Bruno Kieffer pour avoir accepté de juger ce travail ainsi que Martial Piotto et Jean-Philippe Starck, membres invités.

Merci également aux personnes qui m'ont aidé à quelque niveau du projet que ce soit durant ces années de thèse : Sebastian Charbonnier, Pascal Eberling, Claude Ling, Christian Koehler et Katia Zanier, Juan Ramirez Ramon, Yves Nominé, Isabelle Lebars, Marie-Aude Coutouly, Raphaël Recht. Je remercie l'équipe de NMRTEC, et particulièrement Marc pour nos déjeuners "gastronomiques" et discussions au spectro. Je tiens à remercier Nicolas Winssinger et Sofia Barluenga de l'ISIS de m'avoir fourni des molécules passionnantes, les PNA.

Je ne saurais oublier mes amies de thèse qui ont égayé mes journées au laboratoire, Julia et Sandra. Pour nos discussions pas toujours scientifiques et nos déjeuners sur l'herbe. Merci encore Julia pour l'aide que tu m'as apportée en ces derniers mois de rédaction.

Merci à mes amis, d'ici ou d'ailleurs, Pauline, Dolorès, Romain, Alexandre, Céline, Emilie, qui, à distance apportent le réconfort et les parties de rigolades nécessaires au quotidien.

Je remercie l'homme qui partage ma vie, Julien, de me supporter au quotidien et de me soutenir dans les moments de bonheur et aussi de douleur. Merci également à ses parents pour leur soutien.

Je tiens à remercier de tout coeur mes parents, mes frères et ma belle soeur pour leur soutien sans limite durant la thèse et les épreuves qui l'ont malheureusement accompagnée. Vous m'avez été d'une grande aide dans cette étape de ma vie. Et je remercie ma filleule Anaëlle pour ses sourires et tendres bisous à distance qui me réchauffent le coeur.

Merci à tous, de m'avoir aidé à l'élaboration de cette thèse.

À mes parents Marie-Line et Claude,

À mes frères Julien et Jérôme,

À Julien,

Liste des abbréviations

A	Adénine
ADN	Acide DésoxyriboNucléique
ARN	Acide RiboNucléique
BP	Bipolar Pulse
C	Cytosine
CD	Dichroïsme Circulaire
COSY	COrrélation SpectroscopY
D	Dalton ou coefficient de Diffusion
d_f	Dimension fractale
DINAMelt	Di-Nucleic Acid hybridization and Melting prediction
DMSO	Diméthylsulfoxyde
DOSY	Diffusion Ordered Spectroscopy
DSS	DiméthylSilapentaneSulfonate
FAXS	Fluorine chemical shift Anisotropy and eXchange for Screening
G	Guanine
HR-MAS	High Resolution Magic Angle Spinning
HSQC	Heteronuclear Single-Quantum Correlation
ILT	Inverse Laplace Transform
IP	Indice de Polydispersité
jr	Jump & Return
K_d	Constante de dissociation
LED	Longitudinal Eddy-current Delay
MAGI	Membrane Associated Guanylate kinases with Inverted domain
NiNTA	Nickel NitriloTriAceticacid
NOE	Nuclear Overhauser Effect
NOESY	Nuclear Overhauser Effect SpectroscopY
PEO	PolyÉthylèneOxyde
PFG-SE	Pulse Field Gradient Spin Echo
PNA	Peptide Nucleic Acid
pr	Présaturation
RMN	Résonance Magnétique Nucléaire
ROESY	Rotating frame Overhauser Effect SpectroscopY
SAR	Structure Activity Relationship
SNR	Signal to Noise Ratio
STD	Saturation Transfer Difference
STE	STimulated Echo
T	Thymine
T_m	Température de fusion
TOCSY	TOtal Correlation SpectroscopY
WaterLOGSY	Water-Ligand Observation with Gradient SpectroscopY

Table des matières

I	Introduction	1
	Bibliographie	4
II	Mesure de l'indice de polydispersité des PEO par DOSY	6
II.1	Introduction	6
II.2	Mesures de diffusion en RMN	7
II.3	Généralités sur les polymères	11
II.3.1	Masse molaire moyenne	11
II.3.2	Indice de Polydispersité	12
II.3.3	Polydispersité et Diffusion	13
II.4	Analyse des polymères par RMN	13
II.5	Corrélation expérience théorie	18
II.6	Publication dans Journal of Magnetic Resonance	19
II.7	Conclusion	25
	Bibliographie	26
	Annexes	28
A	Standards et mélanges de PEO	29
B	Macro en python pour la détermination de l'IP sur NMRnotebook	32
III	Etude d'Acides Nucléiques Peptidiques	35
III.1	Introduction sur les Acides Nucléiques Peptidiques	35
III.1.1	Principe et description des PNA	35
III.1.2	Les différents PNA analysés	39
III.1.3	Température de fusion et stabilité des PNA en solution	42
III.2	Le DINAMelt Web Server	42
III.3	Analyse des PNA par RMN	45
III.3.1	Expériences RMN à une dimension	45
III.3.2	Expériences RMN à deux dimensions	49
III.3.3	Variation de température suivie par RMN	51
III.3.4	Interprétation des spectres RMN des PNA	53
III.4	Mesures biophysiques additionnelles	76
III.4.1	Hyperchromicité, température de fusion et structure secondaire	76
III.4.2	Mesures de Dichroïsme Circulaire	77
III.4.3	Analyse de la structure secondaire	79
III.5	Conclusion	85
	Bibliographie	87
	Annexes	89
C	Principe et description des PNA	90

D	Stratégies thérapeutiques liées à l'utilisation des PNA	92
E	Formules chimiques semi-développées des PNA	94
F	Le DINAMelt Web Server	97
G	Spectres RMN des PNA	100
H	Dichroïsme Circulaire et Mesures d'absorbance des PNA	113
IV	Utilisation de la technologie HR-MAS pour les mesures d'interaction protéine-ligand	117
IV.1	Introduction et Principe de la technologie RMN HR-MAS	117
IV.1.1	Théorie de la RMN HR-MAS	118
IV.1.2	Le couplage dipolaire	119
IV.1.3	Généralisation du couplage dipolaire et tenseur de rang 2 . .	120
IV.1.4	Susceptibilité magnétique	120
IV.1.5	Angle magique et rotation	121
IV.1.6	La Haute Résolution	121
IV.1.7	Applications de la HR-MAS	122
IV.2	Système biologique utilisé pour l'étude	123
IV.2.1	Protéine PDZ2/6	124
IV.2.2	Préparation des échantillons, expressions, purifications . . .	125
IV.2.3	Préparation des peptides utilisés pour les interactions	126
IV.2.4	Protéine HSP90	128
IV.3	Analyses HR-MAS de protéines	129
IV.3.1	Expériences HR-MAS en phase liquide	129
IV.3.2	Méthyl-SOFAST-HMQC	130
IV.3.3	Expériences HR-MAS en phase greffée	134
IV.3.4	Comparaison 400 MHz - 800 MHz	139
IV.4	Publication dans J. Pharm. Biomed. Anal.	142
IV.5	Conclusion	149
	Bibliographie	151
	Annexes	158
I	Introduction et principe : PDZ2/6 et HR-MAS	159
J	Analyse HR-MAS de protéines	163

CHAPITRE I

Introduction

Ces deux dernières décennies la RMN a beaucoup évolué, au point de devenir un outil d'analyse de choix en biophysique. La RMN permet d'étudier à la fois la structure et la dynamique de molécules biologiques (protéines, acides nucléiques...). De nombreuses approches basées sur la RMN, ont été récemment développées pour le suivi et la caractérisation des interactions moléculaires, [Pellecchia 2005]. Ce nouvel aspect de la RMN offre un intérêt majeur en biologie structurale et en recherche de molécules actives (drug discovery), [Pellecchia 2008].

Les interactions moléculaires peuvent être de divers types et de divers degrés de complexité. Ces dernières se font *via* la formation de liaisons faibles de type liaisons ioniques, liaisons hydrogènes et / ou liaisons de Van der Waals entre deux molécules. Elles peuvent avoir lieu entre une protéine et un ligand, entre une enzyme et un substrat, entre deux protéines, entre acides nucléiques... Dans les protéines les interactions moléculaires permettent la formation de structures tridimensionnelles [Pearl 2006], [Sugase 2007]. Au sein de brins d'acides nucléiques elles peuvent engendrer la formation d'hélices α (protéine) ou de duplex, triplex et quadruplex d'acides nucléiques (ADN, ARN). Au sein de polymères elle peuvent permettre la formation de gels, [Shestakova 2011], et la liste n'est pas exhaustive. Face à cette complexité, la RMN possède de nombreux outils pour l'étude de ces interactions, [Pellecchia 2002], [Meyer 2003], [Pellecchia 2005]. C'est une technique très polyvalente, et les interactions peuvent être mesurées dans une gamme de 10 nM à plusieurs dizaines de mM .

En premier lieu nous citerons les techniques les plus facilement réalisables en RMN telles la cartographie des déplacements chimiques et l'analyse de forme de raie. Lorsqu'une interaction a lieu entre deux molécules, une protéine et un ligand par exemple, les signaux de résonance de chacun en sont modifiés, [Hajduk 2000]. Le déplacement chimique d'un noyau précis apporte alors des informations importantes. Il est plus aisé de suivre un signal proton du ligand que celui d'une protéine qui présentera de nombreux signaux et des recouvrements de raies importants. Suivre les déplacements chimiques du ligand peut être fait à partir d'expériences de titration. Cependant, la protéine peut être elle aussi suivie, mais elle le sera plus aisément à l'aide d'expériences de corrélations hétéronucléaires, [Quinternet 2012]. Parmi les expériences hétéronucléaires, la méthode dénommée SAR (Structure Activity Relationship) [Shuker 1996] se base sur le suivi du signal RMN des azotes présents dans la protéine. La méthode SAR nécessite de travailler avec une protéine marquée à l'azote-15 afin de créer une carte, hétéronucléaire à deux dimensions, de référence. Cette carte est ensuite comparée à celle acquise avec la protéine en présence de ligands. En cas de décalage des signaux de résonance de certains acides aminés l'interaction est indiquée, [Röhrig 2007], [Moore 1999]. Une autre technique basée sur

les mesures de déplacement chimique avec utilisation du Fluor-19 est nommée FAXS (Fluorine chemical shift anisotropy and exchange for screening), [Dalvit 2003].

Puis, la RMN dispose de techniques basées sur le transfert d'aimantation intermoléculaire. Ces méthodes reposent sur l'effet Overhauser présent dans les molécules (NOE), effets qui sont très utiles pour la détermination structurale de molécules en solution, [Neuhaus 2000]. Dès qu'un ligand entre en contact avec un substrat, son NOE est considérablement modifié. Ce changement est la base de diverses expériences de RMN pour détecter une interaction moléculaire. Par exemple, le STD (Saturation Transfer Difference), [Mayer 1999], est une observation du transfert de saturation par spin diffusion entre un substrat et son ligand, [Klein 1999], [Meinecke 2001], [Kobayashi 2010], [Begley 2013]. Un signal proton du substrat est irradié, tandis que celui du ligand ne l'est pas. Ainsi dès que le ligand entre en interaction avec le substrat, il devient lui aussi saturé. Par différence de la mesure de l'intensité du spectre RMN entre le signal de référence et celui où la protéine a été saturée, le spectre des molécules qui sont entrées en interaction avec la protéine est obtenu. Ainsi, il est possible de déterminer les zones proches ou non de la zone de saturation. Cette technique permet aussi d'effectuer des expériences de compétition entre plusieurs ligands, [Wang 2004]. Une autre méthode basée sur le transfert d'aimantation est la WaterLOGSY (Water Ligand Observation with Gradient Spectroscopy), [Tato 2000]. Le principe est le même que pour le STD sauf que cette fois le transfert d'aimantation est observé entre l'eau et le ligand par le biais de la protéine. Lorsque la protéine est ajoutée, le NOE apparait (le spectre RMN devient négatif). Il y a NOE entre le ligand et l'eau lorsqu'ils sont en contact avec la protéine, c'est-à-dire lors de l'interaction.

En dernier lieu, d'autres méthodes basées sur la RMN s'avèrent aussi très utiles pour l'étude des interactions moléculaires, les mesures de relaxation et de diffusion. Toutes deux basées sur la dynamique des molécules, les mesures de relaxation permettent d'étudier la relaxation transverse (R_2) et longitudinale (R_1), [Hajduk 1997]. Cette méthode exploite les différences de taux de relaxation entre une protéine (grand temps de relaxation) et un ligand (faible temps de relaxation).

Les mesures de diffusion, quant à elles, discriminent les molécules en fonction de leur propriétés de diffusion. Si un ligand interagit avec une protéine, alors la diffusion du ligand va en être modifiée. Le tableau suivant, regroupe les caractéristiques des ligands libres et liés et des protéines en fonction de la technique de RMN employée.

	Ligand libre	Protéine	Ligand complexé
Largeur de raie	fine	large	élargie
Relaxation	rapide	lente	accélérée
NOE	faible (+)	fort (-)	faible (-)
Diffusion	rapide	lente	ralentie
Saturation de la protéine	non saturé	saturé	saturé
NOE avec eau	positif	négatif	négatif

FIGURE I.1 – Caractéristiques des ligands et protéines selon la méthode de RMN utilisée.

La RMN offre de nombreuses possibilités pour l'étude des interactions molé-

culaires. Malheureusement elle ne permet pas l'étude de tous types de solutions et systèmes complexes. Dans le cas de mélanges complexes, d'autres types d'interactions entrent en jeu. Un tel mélange peut présenter de nombreuses espèces disparates, ou encore une distribution de propriétés. C'est le cas par exemple pour des polymères en solution.

Les polymères sont caractérisés par différentes grandeurs physiques, dont l'indice de polydispersité qui est défini comme étant la distribution des masses molaires des différentes macromolécules présentes au sein de la solution. Ce paramètre dépend de deux grandeurs caractéristiques des polymères, la masse moléculaire moyenne en nombre et la masse moléculaire moyenne en masse. Les polymères sont un système difficile à analyser en RMN, pour lequel aucune des techniques énumérées ci-dessus n'est adaptée à la détermination de ces paramètres. Le but de notre étude est de démontrer que les deux masses moléculaires caractéristiques des polymères sont accessibles par RMN. Pour cela nous allons utiliser des mesures de diffusion afin d'accéder aux masses moléculaires moyennes en nombre et en masse. L'accès à ces masses moléculaires, nous garantit ensuite la détermination de l'indice de polydispersité. L'étude porte sur des polymères de type oxydes de polyéthylènes sur lesquels nous réalisons des expériences de DOSY, [Morris 1992].

Dans un deuxième temps, nous choisissons un système un peu plus complexe, les acides nucléiques peptidiques (PNA). Les PNA sont des molécules chimiques mimétiques des nucléotides (ADN ou ARN). Ce sont des objets codifiés, synthétisés pour former des interactions avec l'ADN ou l'ARN afin de former des complexes stables. Les PNA sont des molécules pouvant former des interactions non covalentes par le biais de leurs acides nucléiques. Ce sont des mélanges complexes présentant eux aussi plusieurs espèces disparates en solution, avec la présence d'impuretés liées à la synthèse organique. Nous allons étudier des PNA en solution afin de déterminer quelles sont les interactions mises en jeu, et quels complexes se forment lorsqu'ils sont seuls en solution. Pour cela nous utiliserons la RMN et les techniques de mesure de déplacement chimique. Des expériences homo- et hétéro-nucléaires seront réalisées afin de déterminer quels types de complexes sont formés par les PNA en solution et quelle est leur stabilité.

Dans un dernier temps, nous étudierons un autre type d'interaction moléculaire : l'interaction entre une protéine et son ligand. La différence avec les méthodes actuelles de mesure d'interaction protéine-ligand, est ici la fixation de la protéine sur un support solide. Le système devient alors un mélange hétérogène présentant toutes les caractéristiques de mélanges complexes. Pour l'étude de tels systèmes hétérogènes, la RMN seule n'est plus suffisante. Ainsi, nous mettrons en avant la technologie HR-MAS qui est une technique de RMN peu utilisée en biologie moléculaire, mais qui permet d'analyser des échantillons hétérogènes. Cette technique est largement employée dans le domaine de la chimie, [Espinosa 2011] et en métabolomique, [Cheng 1997], nous allons ici démontrer toute son utilité pour le suivi des interactions protéine-ligand.

Au travers de ces trois études, nous présentons une nouvelle approche de la RMN face à différents systèmes complexes. Et nous essaierons de développer de nouveaux descripteurs, moins fins mais plus utilisables dans le cas de nos mélanges complexes.

Bibliographie

- [Begley 2013] Begley D.W., Moen S.O., Pierce P.G. et Zartler E.R. *Saturation transfer difference NMR for fragment screening*. *Curr Protoc Chem Biol*, vol. 5, no. 4, 2013. (Cité en page 2.)
- [Cheng 1997] Cheng L.L., Ma M.J., Becerra L., Ptak T., Tracey I., Lackner A. et González R.G. *Quantitative neuropathology by high resolution magic angle spinning proton magnetic resonance spectroscopy*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, vol. 94, no. 12, 1997. (Cité en page 3.)
- [Dalvit 2003] Dalvit C., Fagerness P.E., Hadden D.T.A., Sarver R.W. et Stockman B.J. *Fluorine-NMR experiments for high-throughput screening : theoretical aspects, practical considerations, and range of applicability*. *J Am Chem Soc*, vol. 125, no. 25, 2003. (Cité en page 2.)
- [Espinosa 2011] Espinosa J.F. *High resolution magic angle spinning NMR applied to the analysis of organic compounds bound to solid supports*. *Curr Top Med Chem*, vol. 11, no. 1, pages 74–92, 2011. (Cité en pages 3 et 123.)
- [Hajduk 1997] Hajduk P.J., Olejniczak E.T. et Fesik S.W. *One-Dimensional Relaxation- and Diffusion-Edited NMR Methods for Screening Compounds That Bind to Macromolecules*. *J Am Chem Soc*, vol. 119, no. 50, 1997. (Cité en page 2.)
- [Hajduk 2000] Hajduk P.J., Mack J. et Fesik S.W. *The use of differential chemical shifts for determining the binding site location and orientation of protein-bound ligands*. *J Am Chem Soc*, vol. 122, pages 1241–1242, 2000. (Cité en page 1.)
- [Klein 1999] Klein J., Meinecke R., Mayer M. et Meyer B. *Detecting Binding Affinity to Immobilized Receptor Proteins in Compound Libraries by HR-MAS STD NMR*. *J Am Chem Soc*, vol. 121, no. 22, pages 5336–5337, 1999. (Cité en pages 2 et 123.)
- [Kobayashi 2010] Kobayashi M., Retra K., Figaroa F., Hollander J.G., Ab E., Heetebrij R.J., Irth H. et Siegal G. *Target Immobilization as a Strategy for NMR-Based Fragment Screening : Comparison of TINS, STD, and SPR for Fragment Hit Identification*. *J Biomol Screen*, vol. 15, no. 8, 2010. (Cité en page 2.)
- [Mayer 1999] Mayer M. et Meyer B. *Characterization of Ligand Binding by Saturation Transfer Difference NMR Spectroscopy*. *Angew. Chem. Int. Ed*, vol. 38, no. 12, pages 1784–1788, 1999. (Cité en page 2.)
- [Meinecke 2001] Meinecke R. et Meyer B. *Determination of the binding specificity of an integral membrane protein by saturation transfer difference NMR : RGD peptide ligands binding to integrin $\alpha_{IIb} \beta_3$* . *J Med Chem*, vol. 44, no. 19, 2001. (Cité en page 2.)
- [Meyer 2003] Meyer B. et Peters T. *NMR spectroscopy techniques for screening and identifying ligand binding to protein receptors*. *Angew Chem Int Ed Engl*, vol. 42, no. 8, 2003. (Cité en page 1.)

- [Moore 1999] Moore J.M. *NMR screening in drug discovery*. Curr Opin Biotech, vol. 10, no. 1, 1999. (Cité en page 1.)
- [Morris 1992] Morris K.F., Johnson C.S. et Jr. *Diffusion-Ordered Two-Dimensional Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy*. J. Am. Chem. Soc, vol. 114, 1992. (Cité en pages 3 et 9.)
- [Neuhaus 2000] Neuhaus D. et Williamson M.P. The Nuclear Overhauser Effect in Structural and Conformational Analysis. 2000. (Cité en page 2.)
- [Pearl 2006] Pearl L.H. et Prodromou C. *Structure and mechanism of the Hsp90 molecular chaperone machinery*. Annu. Rev. Biochem., vol. 75, pages 271–294, 2006. (Cité en pages 1 et 128.)
- [Pellecchia 2002] Pellecchia M., Sem D.S. et W uthrich K. *NMR in Drug Discovery*. Nat Rev Drug Discov, vol. 1, no. 3, 2002. (Cité en page 1.)
- [Pellecchia 2005] Pellecchia M. *Solution Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy Techniques for Probing Intermolecular Interactions*. Chem Biol, vol. 12, no. 9, 2005. (Cité en page 1.)
- [Pellecchia 2008] Pellecchia M., Bertini I., Cowburn D., Dalvit C., Giralt E., Jahnke W., James T.L., Homans S.W., Kessler H., Luchinat C., Meyer B., Oschkinat H., Peng J., Schwalbe H. et Siegal G. *Perspectives on NMR in drug discovery : a technique comes of age*. Nat Rev Drug Discov, vol. 7, no. 9, 2008. (Cité en page 1.)
- [Quinternet 2012] Quinternet M., Starck J.P., Delsuc M.A. et Kieffer B. *Unraveling complex small-molecule binding mechanisms by using simple NMR spectroscopy*. Chem. Eur. J., vol. 18, no. 13, 2012. (Cité en pages 1, 131 et 149.)
- [R ohrig 2007] R ohrig C.H., Loch C., Guan J.Y., Siegal G. et Overhand M. *Fragment-Based Synthesis and SAR of Modified FKBP Ligands : Influence of Different Linking on Binding Affinity*. Chem Med Chem, vol. 2, no. 7, 2007. (Cité en page 1.)
- [Shestakova 2011] Shestakova P., Willem R. et Vassileva E. *Elucidation of the Chemical and Morphological Structure of Double-Network (DN) Hydrogels by High-Resolution Magic Angle Spinning (HRMAS) NMR Spectroscopy*. Chem. Eur. J., vol. 17, no. 52, 2011. (Cité en pages 1 et 123.)
- [Shuker 1996] Shuker S.B., Hajduk P.J., Meadows R.P. et Fesik S.W. *Discovering high-affinity ligands for proteins : SAR by NMR*. Science, vol. 274, no. 5292, 1996. (Cité en page 1.)
- [Sugase 2007] Sugase K., Dyson H.J. et Wright P.E. *Mechanism of coupled folding and binding of an intrinsically disordered protein*. Nature, vol. 447, no. 7147, 2007. (Cité en page 1.)
- [Tato 2000] Tato M., Veronesi M., Vulpetti A. et Sundstr om M. *Identification of compounds with binding affinity to proteins via magnetization transfer from bulk water**. J Biomol NMR, vol. 18, pages 65–68, 2000. (Cité en page 2.)
- [Wang 2004] Wang Y.S., Liu D. et Wyss D.F. *Competition STD NMR for the detection of high-affinity ligands and NMR-based screening*. Magn. Reson. Chem., vol. 42, no. 6, 2004. (Cité en page 2.)

Mesure de l'indice de polydispersité des PEO par DOSY

Sommaire

II.1 Introduction	6
II.2 Mesures de diffusion en RMN	7
II.3 Généralités sur les polymères	11
II.3.1 Masse molaire moyenne	11
II.3.2 Indice de Polydispersité	12
II.3.3 Polydispersité et Diffusion	13
II.4 Analyse des polymères par RMN	13
II.5 Corrélation expérience théorie	18
II.6 Publication dans Journal of Magnetic Resonance	19
II.7 Conclusion	25
Bibliographie	26

II.1 Introduction

Les polymères sont des molécules caractérisées par la répétition d'un ou plusieurs motifs monomères. Ils peuvent être linéaires, ramifiés ou systématiques (cas des dendrimères), et sont formés à partir de deux grands types de réactions chimiques : la polymérisation en chaîne ou la polymérisation par étapes. Selon la technique de polymérisation utilisée, les polymères synthétiques présentent une distribution plus ou moins large en taille moléculaire. Afin d'évaluer au mieux cette distribution en masse molaire des différentes macromolécules, un indice a été fixé. L'indice de polydispersité (IP, ou polymolécularité) est défini comme étant la distribution des masses molaires des différentes macromolécules présentes au sein de la solution. L'IP est le ratio de la masse molaire moyenne en masse par la masse molaire moyenne en nombre. Si l'IP équivaut à 1, alors le mélange est monodisperse, c'est-à-dire sans variations de longueur de chaîne. Plusieurs méthodes analytiques permettent de déterminer l'indice de polydispersité avec une grande précision. Nous pouvons citer, la chromatographie d'exclusion stérique qui sépare les polymères ou macromolécules en fonction de leur volume hydrodynamique, ou encore la spectrométrie de masse. Ces méthodes présentent cependant quelques inconvénients tels que : la mise en interaction du polymère avec une phase stationnaire, l'ionisation

des composés ou encore la dilution de l'échantillon. La méthode de mesure de l'indice de polydispersité des polymères par RMN a pour avantage d'être une mesure directe, sans modification de l'échantillon (ionisation, phase solide...) et sans étape de calibration. Cette méthode, principalement basée sur les mesures de diffusion par DOSY, *Diffusion Ordered Spectroscopy*, est présentée ci-après sur des polymères de type Oxyde de PolyÉthylène (PEO).

II.2 Mesures de diffusion en RMN

La diffusion représente le mouvement translationnel aléatoire et non coordonné des molécules en solution. Ce mouvement aléatoire, appelé aussi mouvement Brownien, est décorrélé du "point de départ" de la molécule, et nous fournit la probabilité de présence de cette molécule à un endroit donné. La diffusion des molécules est directement reliée au rayon hydrodynamique de la molécule par la relation de Stokes-Einstein, voir équation II.1.

$$D = \frac{kT}{6\pi\eta r_h} \quad (\text{II.1})$$

Où D représente la diffusion, k la constante de Boltzmann, η la résistance du milieu (viscosité), r_h le rayon de la sphère qui diffuse (à même D pour une molécule étudiée), T la température (moteur du mouvement Brownien).

Plus la température est élevée, plus le mouvement sera rapide. Ce modèle de Stokes-Einstein est défini uniquement pour des sphères diffusant au sein d'un milieu infini. Soit, pour les molécules de taille conséquente ou des micelles, par exemple. Sur des molécules de type polymères, cette relation n'est pas utilisable. En effet, les polymères ne sont pas considérés comme des molécules sphériques et le milieu étudié n'est pas continu.

En 1965, Stejskal et Tanner [Stejskal 1965] décrivent une méthode permettant de mesurer la diffusion des molécules en solution par RMN. Cette expérience de RMN par écho de spin à gradients de champs pulsés (PFG-SE, Pulse Field Gradient Spin Echo) est représentée figure II.1

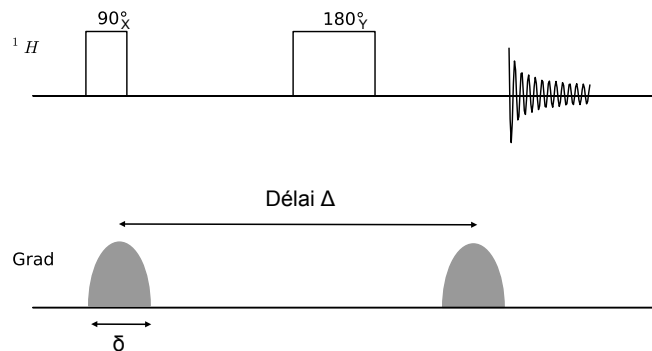


FIGURE II.1 – Schéma de la séquence d'impulsion de base pour la mesure de diffusion par RMN : écho de spin à gradients de champs pulsés. Les séquences d'impul-

sions sont dessinées à l'aide de l'outil **DroSeq** développé par Marie-Aude Coutouly, NMRTEC.

Suite à une première impulsion de 90° , un gradient de champ pulsé est appliqué. Celui-ci introduit un déphasage de l'aimantation globale lié à un codage spatial de la phase des spins en fonction de leur position le long de l'axe z (axe où sont appliqués les gradients). Puis une impulsion de refocalisation, 180° , renverse la précession liée aux déplacements chimiques. Un second gradient de champ à la suite de cette impulsion inverse le codage spatial des phases avant l'enregistrement du signal RMN. Si pendant le délai Δ séparant les deux gradients de champ, les molécules sont stationnaires, le codage et décodage des phases se compensent. L'écho de spin est maximal avec une amplitude gouvernée par la relaxation T_2 . Si les molécules diffusent de manière translationnelle, la position des spins le long de l'axe z change pendant Δ , et engendre un décalage des phases. C'est ce décalage de phase qui est mesuré, l'intensité du signal de l'écho de spin (modulée par la relaxation T_2) devenant atténuée.

Cette atténuation est une fonction exponentielle du coefficient de diffusion dans le cas d'une diffusion isotrope dans les liquides. La mesure de l'atténuation de l'écho de spin en présence de gradients de champs pulsés permet alors de mesurer le déplacement moyen des espèces diffusantes en solution. C'est la loi de dépendance :

$$I = I_0 e^{(-D \Delta q^2)} \quad (\text{II.2})$$

Avec :

$$q = G \delta \gamma \quad (\text{II.3})$$

Où q représente le déphasage, γ le rapport gyromagnétique du noyau étudié, G le gradient appliqué, δ la durée du gradient, Δ le temps d'évolution entre les deux gradients, I l'intensité mesurée, et I_0 l'intensité non atténuée.

Diverses expériences de mesure de diffusion ont été développées à partir de l'écho de spin à gradients de champs pulsés telle la séquence à écho stimulé, [Tanner 1970] présentée figure II.2. La séquence suivante, appelée écho stimulé (STE), sera utilisée comme base pour toutes les expériences 2D DOSY. Suite au déphasage de l'aimantation (premier gradient appliqué) une impulsion 90° bascule la totalité des spins le long de l'axe z . Les molécules diffusent le long de l'axe z et une seconde impulsion 90° permet de lire l'aimantation avant l'application du second gradient. À la différence de l'écho de spin à gradients de champs pulsés, ici l'écho de spin, pendant le délai Δ , est gouverné par le temps de relaxation spin-réseau T_1 .

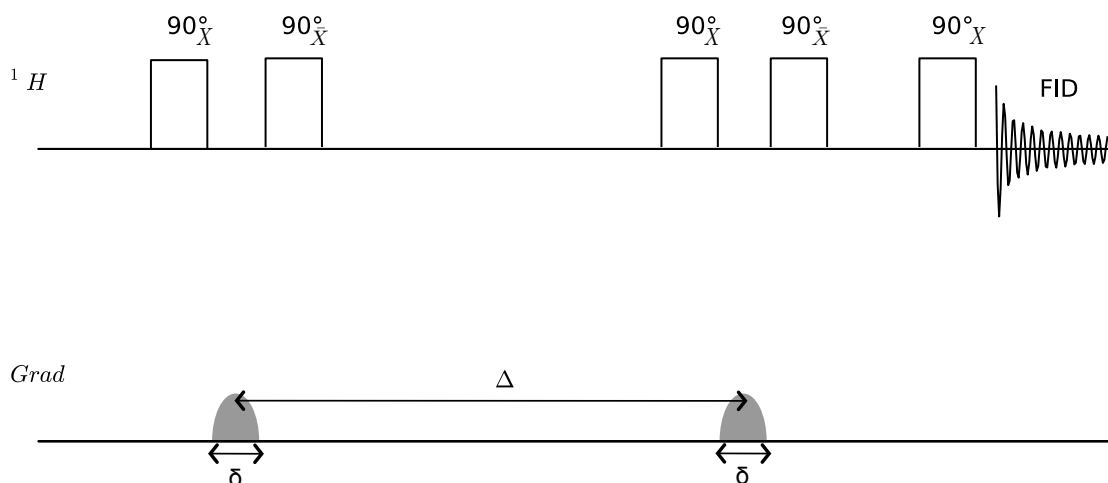


FIGURE II.2 – Schéma de la séquence d'impulsion STE-LED

30 ans plus tard une nouvelle approche de la mesure de diffusion : la DOSY, *Diffusion Ordered Spectroscopy* [Morris 1992] est apportée. Cette méthode est une expérience de RMN à deux dimensions prenant en compte la diffusion comme axe spectroscopique. Les composants d'un mélange ne sont pas séparés en fonction de leur déplacement chimique, mais en fonction de leur coefficient de diffusion D . L'acquisition d'une DOSY consiste en l'accumulation de spectres 1D PFG-SE en faisant varier l'amplitude des gradients tout en maintenant Δ constant.

Avec la loi de dépendance, vue précédemment, suivre la décroissance exponentielle des signaux en fonction de q^2 donne accès à une estimation du coefficient de diffusion des espèces en solution.

Cette méthode est une mesure d'écho de spin à gradients de champ pulsés, cependant l'analyse des données se fait différemment des données 1D PFG-SE seules. La Transformée de Laplace va permettre, dans ce cas présent, d'estimer une distribution des coefficients de diffusion. Dans le cas d'un échantillon monodisperse (une seule molécule, un coefficient de diffusion), nous obtenons une exponentielle décroissante, or dans le cas de mélanges polydispersés (plusieurs molécules, plusieurs coefficients de diffusion) la décroissance est non exponentielle il faut utiliser la Transformée de Laplace Inverse (ILT). Cette ILT est réalisable grâce à l'utilisation de l'Entropie Maximum (MaxEnt) [Delsuc 1998] afin d'obtenir des cartes 2D DOSY analysables.

Dans le but d'obtenir des spectres 2D de qualité satisfaisante, il est important de réduire au maximum les déformations spectrales en éliminant les artefacts. Les courants de Foucault sont, par exemple, un artefact facilement supprimable.

Ces courants de Foucault sont des courants parasites, induits par les impulsions de gradients, autour de la sonde et de l'aimant. Ils créent des champs magnétiques induisant une distorsion du signal RMN. Une méthode simple pour réduire ces courants, est la modification nommée LED (Longitudinal Eddy-current Delay) consistant en l'application d'un délai après la dernière impulsion de gradients. Ainsi, le

signal mesuré après ce délai est absent de distorsions dues aux courants de Foucault, le spectre RMN est plus propre.

Ces courants de Foucault peuvent par ailleurs être réduits en remplaçant les impulsions de gradient par deux impulsions de polarité inversées séparées par une impulsion 180° [Wu 1995], appelée impulsion bipolaire (BP, bipolar pulse). L'impulsion bipolaire est présentée en figure II.3 à droite.

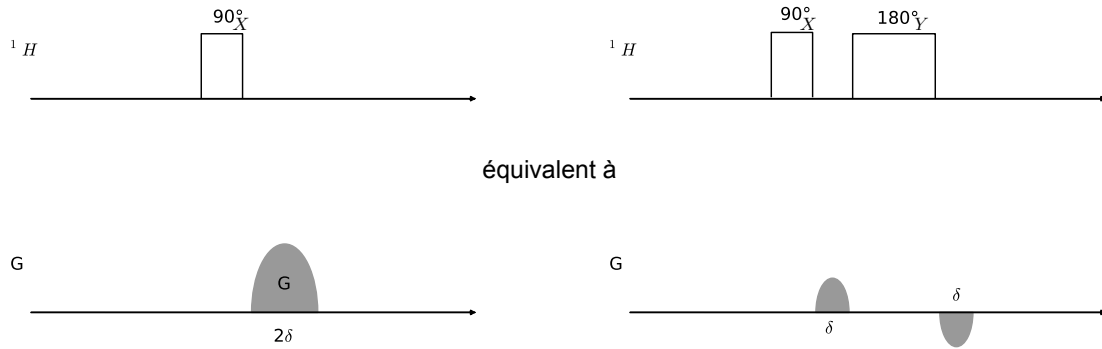


FIGURE II.3 – Schéma d'une impulsion bipolaire BP.

En implémentant la séquence LED avec ces pulses bipolaires, nous obtenons la séquence appelée BP-LED, représentée figure II.4. La séquence BP-LED est utilisée pour toutes les expériences de DOSY présentées au sein de ce chapitre.

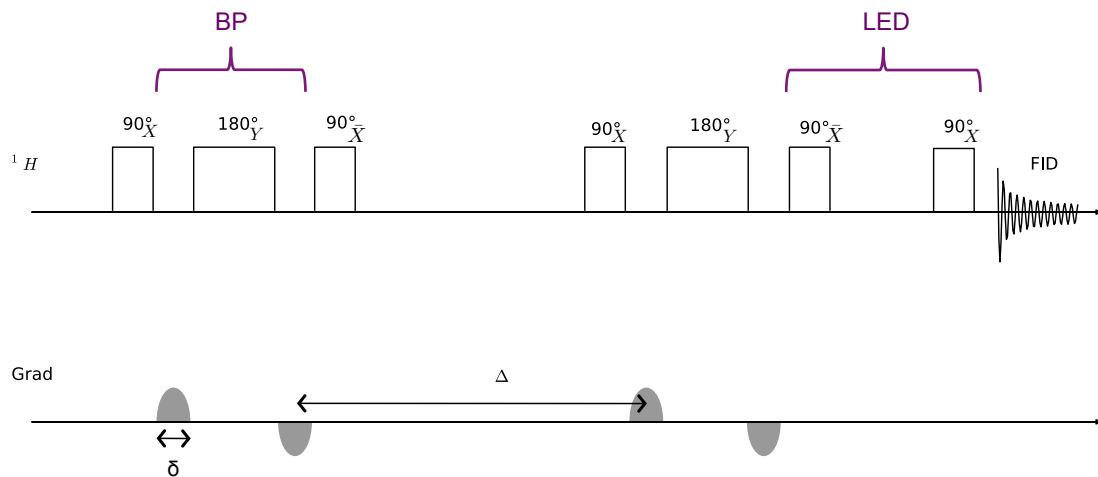


FIGURE II.4 – Schéma de la séquence d'impulsion BP-LED

La RMN DOSY trouve son plus grand intérêt dans son utilisation pour l'analyse de mélanges complexes [Gostan 2004] et de détection de traces. Elle est utilisée dans divers domaines tels que l'industrie agro-alimentaire et pharmaceutique [Balayssac 2009], la chimie supramoléculaire [Cohen 2005] ou les polymères [Li 2012].

II.3 Généralités sur les polymères

Le modèle de diffusion mesurant le repliement des polymères est issu de mesures expérimentales : de nombreux auteurs ont étudié la variation de la diffusion D sur une large gamme de taille de macromolécules, [Wilkins 1999]. La relation entre diffusion D et masse molaire M a ainsi pu être définie, [Augé 2009] :

$$D \propto M^{-d_f} \quad (\text{II.4})$$

Avec d_f la dimension fractale du composé étudié. La dimension fractale peut être décrite comme étant la mesure du remplissage de l'espace en trois dimensions de l'objet étudié. Par exemple, un objet présentant une dimension fractale de 3 remplit l'espace sans laisser de trous (cas d'un cube défini sur 3 axes spatiaux x, y et z). Un objet de dimension fractale 2 est défini selon deux axes (x et y) c'est le cas d'un polymère linéaire "gaussien" (tournant librement sans mémoire). Tandis qu'un objet dont d_f est égale à 1 remplit l'espace de dimension 1, tel une ligne droite. Les valeurs intermédiaires de dimension fractale définissent des objets remplissant partiellement l'espace 3D. Elles sont utilisées comme mesure de la compacité du repliement des molécules. A noter qu'une valeur particulière de d_f est importante : $\frac{3}{5}$. Cette valeur correspond au coefficient de Flory, valeur limite basse pour un polymère (conformation gonflée dans un solvant).

La relation de proportionnalité (II.4) est très utilisée pour la détermination de la masse moléculaire de composés en fonction du coefficient de diffusion [Chen 1995, Viel 2003, Auguin 2004, Crutchfield 2007, Maina 2014].

La dimension fractale utilisée ici pour un PEO dans l'eau est de $d_f = 1.86$ [Chari 1995, Augé 2009].

II.3.1 Masse molaire moyenne

La détermination des propriétés physiques des polymères nécessite de connaître la longueur de chaîne moyenne du polymère formé. Cette longueur moyenne de chaîne, N , est calculée à l'aide des intégrales du spectre 1D ^1H du polymère. La relation qui permet de calculer le nombre de motif N se présente sous la forme :

$$n_h = a(N - 2) + b \quad (\text{II.5})$$

Avec :

n_h , représentant le nombre total d'hydrogènes dans le polymère,
 N , le nombre de monomères dans le polymère (on soustrait 2 car il y a deux extrémités),

a , le nombre d'hydrogènes dans le monomère polymérisé,

b , le nombre d'hydrogènes présents à l'extrémité.

En prenant, A et B les intégrales respectives des chaînes et des extrémités, et k le rapport d'intégration, nous avons :

$$A = k a(N - 2) \quad (\text{II.6})$$

$$B = k b \quad (\text{II.7})$$

et

$$A + B = k n_h \quad (\text{II.8})$$

En faisant le rapport de A sur B, nous obtenons :

$$\frac{A}{B} = \frac{a(N - 2)}{b} \quad (\text{II.9})$$

d'où

$$N - 2 = \frac{bA}{aB} \quad (\text{II.10})$$

$$N = \frac{bA}{aB} + 2 \quad (\text{II.11})$$

Dans notre cas, a=4

b=8 (ou 4 si on intègre seulement le dernier CH₂ de la chaîne du PEO).

Cette longueur de chaîne est souvent exprimée en fonction de la masse molaire moyenne en poids du polymère, c'est-à-dire à la masse moléculaire du monomère, et au nombre de monomères insérés pour la formation du polymère. Cependant les polymères synthétiques sont polydisperses, et ne sont donc pas uniformes en nombre et taille. Ils sont présents sous forme d'une distribution de longueur de chaîne et de poids moléculaires variés. On peut donc distinguer la masse moléculaire moyenne en nombre, M_n , et la masse moléculaire moyenne en masse M_w .

M_n correspond à la moyenne statistique en nombre de polymères présents :

$$M_n = \frac{\sum n_i M_i}{\sum n_i} = N.M \quad (\text{II.12})$$

Où n_i est le nombre de molécules de masse M_i , N la longueur moyenne de chaîne, et M la masse moléculaire du monomère.

M_w , ou masse moyenne en masse, prend en considération la masse moléculaire de la chaîne :

$$M_w = \frac{\sum m_i M_i}{\sum m_i} = \frac{\sum n_i M_i^2}{\sum n_i M_i} \quad (\text{II.13})$$

Avec m_i la masse de molécules de masse molaire M_i .

II.3.2 Indice de Polydispersité

L'indice de polydispersité représente la distribution en taille de la population de polymères présents. Il est égal au ratio de M_w par M_n :

$$IP = \frac{M_w}{M_n} \quad (\text{II.14})$$

M_n et M_w sont des paramètres statistiques d'un même polymère avec une pondération différente (masse ou nombre de molécules). Cette différence implique la

supériorité (ou l'égalité) de M_w par rapport à M_n , engendrant un Indice de Polydispersité toujours supérieur ou égal à 1.

Un polymère dont la synthèse est parfaitement contrôlée verra son IP compris entre 1,02 et 1,10, tandis qu'un polymère fabriqué par polymérisation en chaîne aura un IP compris entre 1,5 et 2,0 et autour de 2 pour un polymère synthétisé avec la méthode de polymérisation par étapes.

II.3.3 Polydispersité et Diffusion

M_n et M_w sont des fonctions statistiques de la distribution de masse d'un polymère mais avec différentes pondérations. Nous pouvons faire la remarque que, de manière équivalente, les signaux RMN mesurés correspondant aux extrémités de la chaîne sont pondérés par le nombre de molécules tandis que les signaux RMN du polymère entier sont pondérés par la taille et donc par la masse des molécules.

La RMN étant sensible aux paramètres statistiques moyen des échantillons, M_n et M_w peuvent être observés en fonction du signal RMN de l'extrémité ou de la chaîne des polymères respectivement. Ainsi, à l'aide de l'équation (II.4), les coefficients de diffusion correspondants à M_n et M_w : D_n et D_w respectivement, peuvent être déterminés. Par conséquent, le ratio des coefficients de diffusion va nous permettre d'accéder à la valeur de l'Indice de Polydispersité :

$$IP = \left(\frac{\langle D_w \rangle}{\langle D_n \rangle} \right)^{-d_f} \quad (\text{II.15})$$

II.4 Analyse des polymères par RMN

L'étude porte sur une série de PEO linéaires. Dix sept PEO monodisperses standards compris dans une gamme de masse allant de 106 Da à 10730 Da ont été acquis. Chaque standard est dissous à 10% en masse dans de l'eau Milli-Q. Ces solutions ont ensuite été utilisées afin de former quinze mélanges de diverses polydispersités comprises entre 1,04 et 5,23 à une concentration allant de 0,05% à 1% en masse. Dans chaque mélange a été ajouté 10% en volume d'eau deutériée (D_2O) et 1% en volume d'acide 4,4-Diméthyl-4-Silapentane-1-Sulfonique (DSS, 1mM). Le détail de ces standards de PEO utilisé pour cette étude est donné en Annexe, table A.1. Les mélanges effectués et analysés par RMN sont présentés en Annexe, table A.2.

Prenons un exemple, le mélange nommé I. Il est composé de six différents PEO en proportion molaires variables. Le tableau II.1 regroupe les données du fabricant pour chaque PEO puis les calculs que nous réalisons. Ainsi, IP_{fab} , M_{nfab} et M_{wfab} sont les données propres à chaque PEO selon le fournisseur. n_i et m_i représentent les quantité molaires et massiques de chaque PEO ajouté afin de former le mélange I. Le M_n moyen est calculé selon l'équation II.12 à l'aide des n_i et M_{nfab} . Le M_w moyen est calculé selon l'équation II.13 à l'aide des n_i et M_{wfab} .

Dans ce tableau, les valeurs de $\langle M_n \rangle$ et $\langle M_w \rangle$ sont recalculées chaque ligne (par ajout de PEO par ordre croissant) afin d'observer l'effet d'ajout de divers PEO sur l'indice de polydispersité. Ainsi, les valeurs moyennes de M_n et M_w et IP

du mélange I sont celles représentées en dernière ligne. Ce seront nos valeurs dites théoriques pour la suite de l'étude.

PEO	IP_{fab}	$M_{n, fab}$	$M_{w, fab}$	n_i	m_i	$\langle M_n \rangle$	$\langle M_w \rangle$	$\langle IP \rangle$
985	1,04	955	993,2	3,32	1,38	955,0	993,2	1,04
1050	1,06	1000	1060	3,11	1,38	976,8	1026,6	1,05
1500	1,05	1425	1496,2	2,20	1,38	1091,2	1183,1	1,08
1670	1,04	1615	1679,6	1,96	1,38	1188,2	1307,3	1,10
3770	1,06	3580	3794,8	0,87	1,38	1369,45	1804,77	1,32
5250	1,11	4750	5272,5	0,63	1,38	1544,3	2382,7	1,54

TABLE II.1 – Exemple de calcul de IP , N , M_n et M_w pour le mélange I. $M_{n, fab}$ et $M_{w, fab}$ représentent les valeurs fournies par le fabricant pour chaque PEO étudié. n_i est la quantité molaire de PEO ajoutée et m_i la quantité massique. $\langle M_n \rangle$ et $\langle M_w \rangle$ représentent la moyenne des M_n et M_w calculés, ils sont incrémentés chaque ligne. $\langle IP \rangle$ est le calcul d'IP moyen, incrémenté chaque ligne.

Les analyses RMN sont réalisées sur un spectromètre Bruker Avance I, 500 MHz équipé d'une sonde TXI délivrant des gradients selon l'axe z à une puissance de $G = 53 \text{ G.cm}^{-1}$. Les spectres 1D ^1H sont obtenus par présaturation du signal d'eau avec un nombre de scans de 128 pour 16384 points et un délai de recyclage de 6,1 sec.

Le spectre 1D ^1H d'un mélange de PEO en solution dans $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ (90/10) est présenté figure II.5 après application d'une apodisation de 0,5 Hz, transformée de Fourier et correction de la ligne de base.

Ce spectre est facilement interprétable en raison de sa qualité, d'absence de composés secondaires et de sa faible diversité de groupements protons présents. Ainsi nous pouvons discriminer le signal de la chaîne principale A à celui de B correspondant au signal des protons terminaux du polymère. Le signal C correspond quant-à lui au signal de l'avant dernier groupe méthylène présent sur la chaîne du PEO. Et enfin D et E indiquent les satellites ^{13}C de A .

Comme nous pouvons l'observer sur cet exemple de spectre, les protons présents à l'extrémité du PEO sont clairement identifiés, il est donc possible de calculer la longueur moyenne de chaîne du polymère. Ceci sera le cas pour tous les polymères et mélanges présentés, voir résultats regroupés tableau II.2. Sur chaque spectre 1D proton les signaux correspondants au CH_2 terminaux (B) et aux CH_2 de la chaîne (A) sont intégrés. Ainsi, nous pouvons calculer la longueur moyenne de chaîne N selon la relation II.11.

Sur le spectre présenté, la mesure d'intégration du signal ^1H de la chaîne (A) indique 18,3 donc selon la relation II.11 (ici C est intégré avec A on additionne alors 1 au lieu de 2), nous obtenons $N=19,3$. En reportant ce résultat dans le tableau II.2, nous notons que ce PEO est le mélange L dont $N_{théo}=19,1$.

Sont ensuite réalisées les expériences de mesure de diffusion. Les 2D-DOSY sont acquises selon la séquence BP-LED présentée figure II.4 avec ajout d'une présaturation du signal de l'eau. Les gradients sont appliqués de manière linéaire dans une gamme de valeurs comprise entre $0,5 \text{ G.cm}^{-1}$ et $45,7 \text{ G.cm}^{-1}$ sur quarante points.

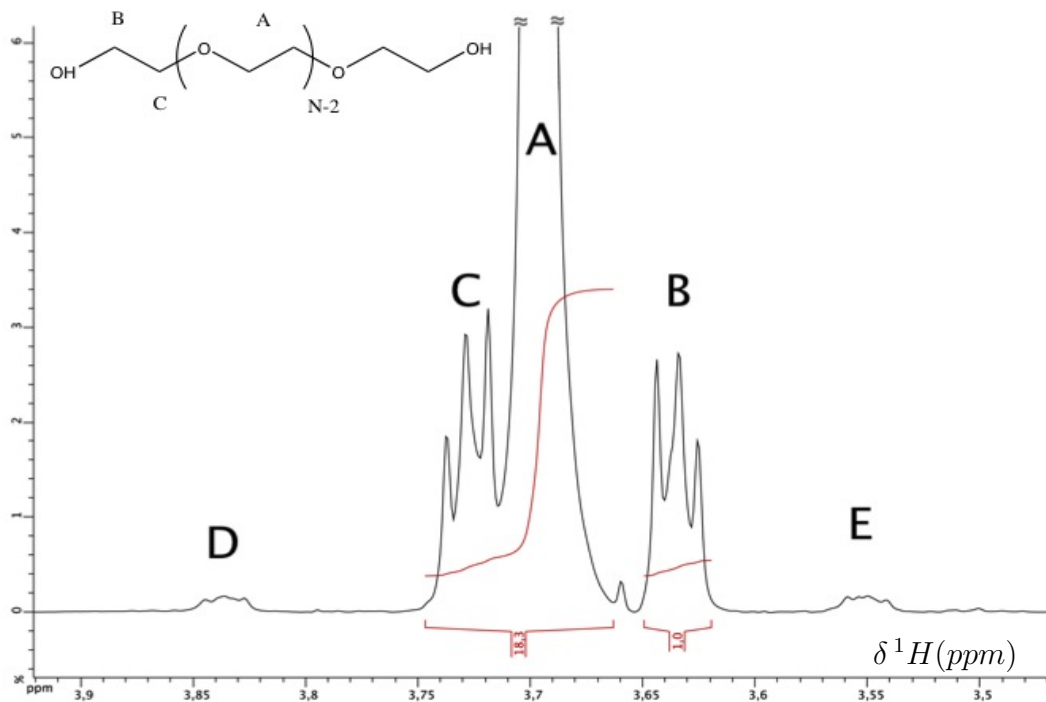


FIGURE II.5 – Spectre 1D ^1H d'un mélange de PEO en solution dans D_2O . Les pics sont attribués tels que représentés sur la formule semi-développée. *A* correspond au signal proton de la chaîne de CH_2 ; *B* au signal terminal et *C* au CH_2 précédant le bout de la chaîne. *D* et *E* sont les satellites ^{13}C de *A*.

Le nombre de scans est fixé à trente deux pour 16384 points portant le temps total d'acquisition à 1 heure et 7 minutes. La durée du gradient δ est fixée à 3 msec et le délai de diffusion Δ est adapté selon l'échantillon pour des valeurs comprises entre 100 et 180 msec. La décroissance du signal proton est suivie et mesurée en fonction de la puissance du gradient appliqué. Nous obtenons ainsi une série de courbes qui sont analysées telles une 2D grâce à l'ILT vue précédemment.

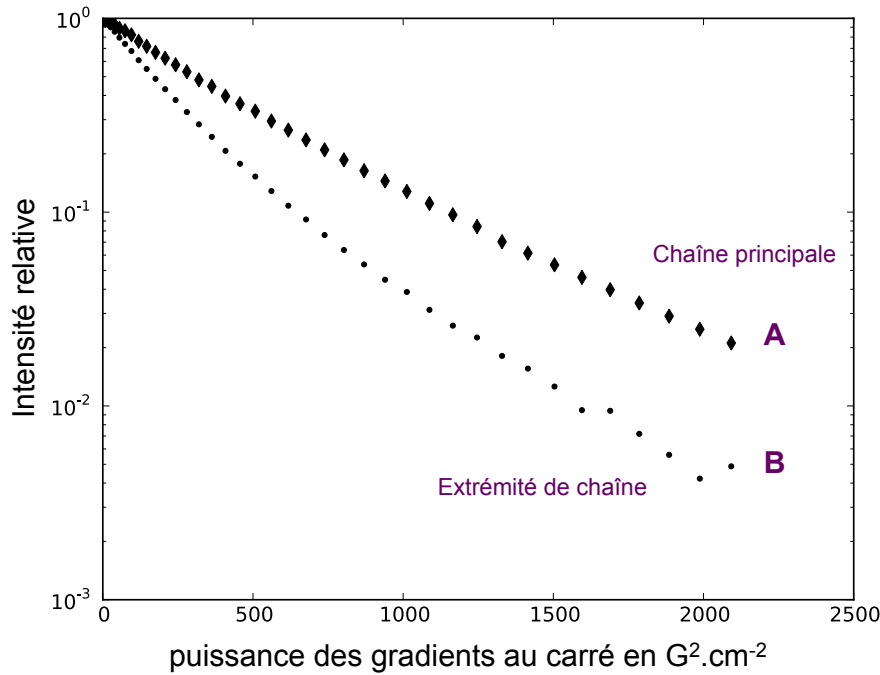


FIGURE II.6 – Courbe logarithmique de la décroissance de l'intensité en fonction de la valeur du gradient au carré pour le mélange L. Les losanges correspondent au signal de la chaîne principale, (*A* figure II.5) et les points correspondent au signal de l'extrémité de chaîne, (*B* figure II.5).

Comme expliqué précédemment (loi de dépendance), observer la courbe de décroissance de l'intensité du signal de l'écho en fonction de la valeur de gradient appliquée nous donne accès au paramètre de diffusion. La figure II.6 représente la décroissance des signaux présents à 3,63 ppm et 3,69 ppm (signaux protons *B* et *A* respectivement, figure II.5). Ces courbes sont obtenues par extraction des colonnes correspondant aux deux pics, après Transformée de Fourier (sur la dimension F2) et correction de la ligne de base. De manière surprenante, nous constatons ici que le signal relatif à un proton de la chaîne (*A*) ne présente pas la même courbe de décroissance qu'un proton terminal (*B*). Les deux signaux présentent des coefficients de diffusion très différents. Ceci s'explique par la différence statistique évoquée en partie II.3.3. Comme attendu pour un mélange polydisperse, les courbes de décroissance ne présentent pas une droite (signature d'une décroissance exponentielle dans un tracé $\log I = f(G^2)$).

La transformée de Laplace inverse de ces courbes de décroissance va nous fournir le spectre 2D DQSY présenté figure II.7.

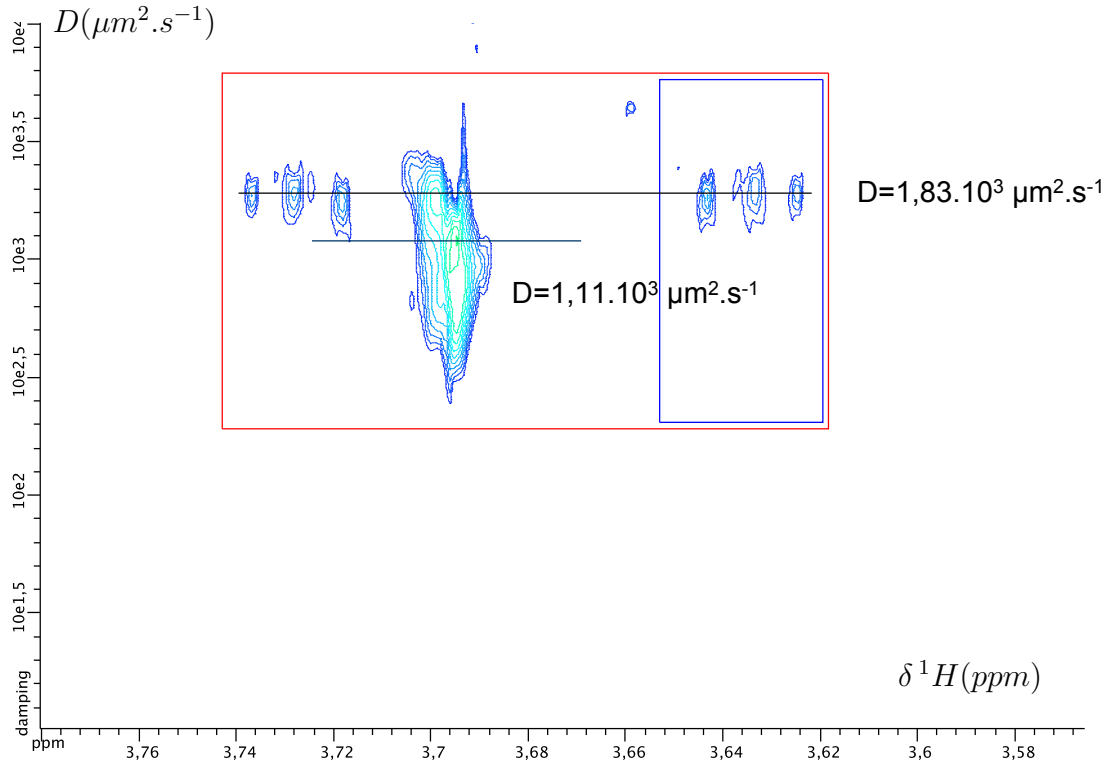


FIGURE II.7 – Spectre 2D DOSY du mélange L. Le carré bleu à droite représente la région intégrée pour la détermination de D_n . D_w est déterminé à l'aide de l'intégrale complète du spectre représenté par le rectangle rouge.

Sur le spectre de DOSY, chaque tache de diffusion représente un type de proton associé soit au monomère de milieu de chaîne soit au bout de chaîne. L'axe horizontal représente le déplacement chimique proton, tandis que l'axe verticale représente le coefficient de diffusion apparent de la molécule étudiée. Les lignes indiquent le centre des taches de diffusion nous permettant d'obtenir une estimation de la valeur moyenne de D correspondante. La différence de coefficient de diffusion apparent entre le signal du proton terminal à 3,63 ppm et les protons de la chaîne à 3,69 ppm est visible. Cette différence est liée à la pondération statistique associée à chaque signal. En effet le signal de A (chaîne principale) est pondéré par le nombre de monomères présents dans le polymère proportionnels à la longueur de chaîne. Le signal de B (extrémités) est pondéré par le nombre d'extrémités présentes dans le polymère proportionnel au nombre de molécules, quelque soit la longueur de chaîne.

Pour une population monodisperse, A et B présenteront la même statistique de distribution et les coefficients de diffusion seront mesurés égaux. Pour une population polydisperse, les longues chaînes sont sur-représentées dans la mesure de A par rapport à B. Cela a pour effet de biaiser la mesure de D vers les longues chaînes, et donc le D apparent mesuré par A sera plus faible (diffusion plus lente) que le D mesuré sur B. C'est cette différence de pondération statistique qui nous permet de déterminer D_n (associé à B) et D_w (associé à A).

D_n et D_w sont mesurés de manière plus précise avec l'aide de l'intégration du signal de diffusion. Comme le signal de diffusion n'est pas de forme régulière propre,

le calcul de l'intégrale se fait en mesurant le barycentre du signal. Les signaux de diffusion sont encadrés par une zone définissant la limite pour la mesure de l'intensité du signal. Le rectangle bleu, figure II.7, représente la partie extrême du polymère, ainsi, le barycentre de ce cadre nous donne accès à la valeur moyenne de D_n . La zone encadrée de rouge représente le polymère entier, la mesure du barycentre du rectangle rouge nous indique alors la valeur moyenne de D_w .

Un outil de mesure du barycentre a été développé exclusivement pour cet usage sur le logiciel NMRnotebook®.

La macro est donnée pour information en Annexe B.1

II.5 Corrélation expérience théorie

Sur chaque mélange préparé a été déterminée la longueur moyenne de chaîne à l'aide des spectres 1D proton. Nous avons aussi réalisé les mesures de diffusion sur chaque mélange afin de déterminer les valeurs de diffusion D_n et D_w pour obtenir M_n et M_w avec l'équation (II.4). Une fois ces masses molaires obtenues, nous calculons l'IP à l'aide de la formule (II.14). Le tableau II.2 ci-dessous regroupe les données théoriques du fournisseur et les données expérimentales que nous avons obtenues.

mélange	N		IP		M_n (g.mol ⁻¹)		M_w (g.mol ⁻¹)	
	théo	exp	théo	exp	théo	exp	théo	exp
A	36.3	36.1	1.04	1.06	1615	1588.4	1679.6	1683.7
B	49.4	53.7	1.07	1.08	2190	2362.8	2343.3	2551.8
C	107.5	120	1.11	1.12	4750	5280	5272.5	5913.6
D	8.7	8.7	1.12	1.12	400.6	382.8	447.5	428.7
E	8.8	9.5	1.14	1.17	403.4	418	459.7	489.1
F	23	23.8	1.26	1.31	1021	1047.2	1268.3	1371.8
G	71.5	85.3	1.28	1.28	3165	3753.2	4051.2	4804.1
H	44.8	47.5	1.34	1.15	1989.3	2090	2518	2403.5
I	34.7	37	1.54	1.5	1544.3	1628	2382.7	2442
J	38.1	39.8	2.01	2.2	1696.9	1751.2	3238.5	3852.6
K	15.7	15.9	2.12	1.89	710.3	699.6	1332.1	1322.2
L	19.1	19.3	2.51	2.24	858.5	853.6	2008.2	1912.1
M	21.4	24.8	3.3	2.41	961.7	1091.2	3062.8	2629.8
N	22.4	23.8	3.41	2.75	1001.7	1047.2	3328	2879.8
O	13.5	13.9	5.23	4.48	611.3	611.6	3099.6	2740

TABLE II.2 – Résultats théoriques et expérimentaux de l' IP , N , M_n et M_w .

Pour plus de visibilité, les résultats ont également été représentés sous forme de courbes de corrélation des valeurs théoriques en fonction des valeurs expérimentales, voir figure II.8. La figure II.8 représente les corrélations entre les résultats expérimentaux et théoriques. Sur la figure de gauche, les carrés bleus correspondent à N la longueur de chaîne du polymère étudié et la droite rouge représente $N_{théo} = N_{exp}$. Nous observons clairement que la corrélation est quasi parfaite, les valeurs expéri-

mentales obtenues par intégration des signaux protons sont très proches des valeurs théoriques.

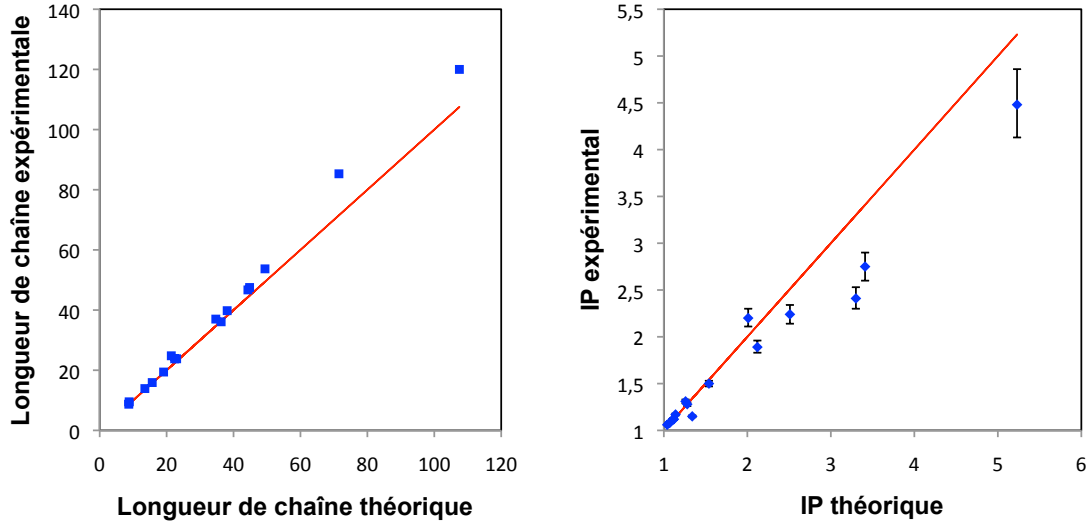


FIGURE II.8 – Droites de corrélations de la longueur moyenne de chaîne (gauche) et de l'indice de polydispersité (droite). Les droites rouges correspondent à *théo* = *exp*. L'IP est calculé avec une $d_f = 1,86$ (losanges bleus), $d_f = 1,96$ pour la barre supérieure et $d_f = 1,76$ pour la barre inférieure.

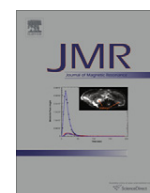
Afin d'extraire l'IP des mesures de DOSY, un seul paramètre peut être variable : la dimension fractale. Comme vu précédemment, la d_f du PEO dans l'eau a été mesurée indépendamment et possède une valeur de 1,86. Sur la courbe de corrélation de mesure de l'indice de polydispersité (courbe de droite), plusieurs IP sont représentés en fonction de d_f . Les losanges bleus indiquent l'IP théorique calculé en fonction de l'IP expérimental obtenu à l'aide des mesures de DOSY. Les traits noirs indiquent les variations d'IP en considérant une autre valeur de dimension fractale. Ainsi le trait supérieur regroupe les points calculés avec une $d_f = 1,76$ et les traits inférieurs aux IP calculés avec $d_f = 1,96$. Ici la corrélation entre résultats expérimentaux et théoriques est très bonne pour des indices de polydispersité inférieurs à 4. La marge d'erreur est un peu plus grande pour un polymère présentant une valeur d'IP proche de 5. À la vue de cette courbe, nous notons que l'impact de la variation de d_f sur le résultat n'est que peu important.

II.6 Publication dans Journal of Magnetic Resonance

Ces travaux ont fait l'objet d'une publication en 2011 au sein de la revue *Journal of Magnetic Resonance*.

J. Viéville et al. / Journal of Magnetic Resonance 212 (2011) 169–173.

L'article est présenté ci-après.



Polydispersity index of polymers revealed by DOSY NMR

Justine Viéville^{a,b}, Matthieu Tanty^{a,b}, Marc-André Delsuc^{a,b,*}

^a Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire (IGBMC), UMR 7104, 1 rue Laurent Fries, BP 10142, 67404 Illkirch cedex, France

^b NMRTec, Bioparc B, boulevard Sébastien Brant, 67400 Illkirch, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 17 May 2011

Revised 22 June 2011

Available online 1 July 2011

Keywords:

Polymer

Polydispersity

DOSY

Fractal dimension

Inverse Laplace transform

ABSTRACT

The polydispersity of a polymer chain is usually measured by its polydispersity index (PDI). In this study we present a method which allows to estimate the PDI of linear polymers from a simple diffusion experiment.

The approach is based on the differential diffusion profile observed for the main polymer chain signal versus the extremity signal. From this difference, a statistical analysis of the DOSY spectrum allows the PDI to be estimated accurately, to the condition that the Flory coefficient of the polymer chain is known. Alternatively, the mass average molar mass M_w and the number average molar mass M_n can be extracted separately from the same spectrum.

Results on PEO mixes reveal that, using this new method, PDI can be estimated with a very good accuracy. This method can easily be applied to almost any kind of linear polymers.

© 2011 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Polymers are characterized by a distribution of molecular masses. For linear polymers this distribution can be expressed in terms of average chain length and polydispersity of the chain length. The average chain length is routinely measured by NMR spectroscopy by measuring the ratio of the integrals of the main chain signal to the extremity signals.

Self-diffusion, measured by pulsed field gradient NMR (PFGNMR) is sensitive to molecular size and provides an approach to the determination of the distribution of molecular mass. In the case of linear polymer chains, the diffusion coefficient is linked to the molecular mass through the following equation:

$$M \propto D^{-d_f} \quad (1)$$

where D is the diffusion coefficient of the molecule, M its mass and d_f its fractal dimension [1–3]. The fractal dimension is a measure of the way the chain extends into the solvent, and is equal to the inverse of the Flory coefficient ν : $d_f = 1/\nu$. It is comprised between 5/3 and 3 [4].

The effect of polydispersity on PFGNMR measurements has already been well studied [5–7] and is known to lead to non exponential decays, even for weak polydispersity [8]. The analysis of non exponential decays requires the use of Inverse Laplace Trans-

form (ILT) in order to estimate the molecular mass distribution. This is an ill-posed mathematical problem, to which an approximate solution can only be constructed. This was investigated by Chen et al. using the CONTIN algorithm [1], but due to the approximate reconstruction, it is not possible to extract a useful value of the polydispersity index from this approach.

Polydispersity is commonly measured by the polydispersity index (PDI). For a given polymer sample, it is defined as the ratio of the mass average molar mass (M_w) to its number averaged molar mass (M_n)

$$PDI = \frac{M_w}{M_n} \quad (2)$$

For a homopolymer linear chain, assuming that the mass of the chain is equal to the product of its length by the mass of the monomeric unit M , the average molecular masses M_n and M_w expressions are given in Eqs. (3) and (4),

$$M_n = \frac{\sum n_i M_i}{\sum n_i} = NM \quad (3)$$

$$M_w = \frac{\sum m_i M_i}{\sum m_i} = \frac{\sum n_i M_i^2}{\sum n_i M_i} \quad (4)$$

where n_i is the number of molecules of mass M_i , m_i the mass of molecules of mass M_i , and N the averaged chain length.

M_n and M_w are statistical features of the same polymer distribution but with different weightings. Because of this difference, M_w is always greater than or equal to M_n , and PDI is always greater than or equal to 1.

NMR parameters are also obtained as statistical average on the whole sample. Signals measured from the extremity of the chain

* Corresponding author at: Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire (IGBMC), UMR 7104, 1 rue Laurent Fries, BP 10142, 67404 Illkirch cedex, France. Fax: +33 (0)3 68 85 47 18.

E-mail addresses: vieville@igbmc.fr, justine.vieville@nmrtec.com (J. Viéville), tanty@igbmc.fr (M. Tanty), delsuc@igbmc.fr (M.-A. Delsuc).

are weighted by the number of molecules, while signals measured on the whole polymer chain, extremities included, are weighted by mass of the molecules. Thus, the two different weightings used for defining M_n and M_w can be observed in NMR, depending on the measure being performed either on the extremities or on the whole polymer chain.

This property applies also to PFGNMR measurement of diffusion coefficients. From Eqs. (1) and (2), it is thus possible to express PDI as follows:

$$PDI = \left(\frac{\langle D_w \rangle}{\langle D_n \rangle} \right)^{-d_f} \quad (5)$$

where $\langle D_n \rangle$ is the mean diffusion coefficient measured from the ILT analysis of the PFGNMR signal of the extremity units, and $\langle D_w \rangle$ the mean diffusion coefficient measured for the whole polymer.

From this theoretical presentation, it appears that the polydispersity index can be determined from a simple PFGNMR measurement, by comparing the signals originated from the main chain to the signal of the extremities, and applying Eq. (5), given the preliminary knowledge of fractal dimension of the chain.

To confirm this hypothesis, 2D-DOSY spectra were registered for different mixes of poly-ethyleneoxide (PEO) in water with calibrated chain lengths and PDIs. Experimental values were confronted to theoretical ones.

2. Results and discussion

2.1. 1D NMR

The 1D- ^1H NMR spectrum of mix L is shown in Fig. 1. Very few peaks are observed and are easily assigned. Besides the resonance at 3.7 ppm of the principal chain, other resonances are observed. Four different spin systems can be identified. The signal A corresponds to the chain methylene group, and the signal B to the pen-

ultimate methylene. The signal C corresponds to the signal assigned to the terminal methylene group bearing the hydroxy function, and last signals D and E show the ^{13}C -satellites of the chain protons. As one can see on this example, protons on the PEO's extremities are clearly identified. It is the case for all the mixes which makes the calculation of the average chain length N always possible.

2.2. The DOSY experiment

Fig. 2 shows the NMR signal decay for signals A and C from PEO mix L versus the square of the gradient strength. Both curves are columns extracted respectively at 3.69 ppm and 3.63 ppm, from the diffusion experiment performed on mix L after Fourier transform and baseline correction. As expected, being obtained from a quite polydisperse sample (here $PDI = 2.51$) both curves present a strong non-exponential decay, as can be seen from the non-linearity of the log-plot. The ILT analysis of the decays produces a DOSY spectra with peaks broaden along the diffusion axis. However, despite this broadening, this experiment reveals two different diffusion regimes. Due to marked difference in the diffusion coefficients, the 2D-DOSY spectrum displayed in Fig. 3 unequivocally confirms that two different diffusion profiles can be extracted. In this example, the DOSY peak summit measured for the extremity was found to be $D = 1.83 \times 10^3 \mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$, whereas the DOSY peak summit measured for the chain was found to be $D = 1.11 \times 10^3 \mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$.

It should be noted that the measure relies on the complete measurement of all the different polymers present in the sample. In consequence, the PFG experiment should be designed to allow a signal attenuation from the longest chains, sufficient for a correct measurement of their diffusion coefficient. In the present case, all experiments have been performed in the same conditions, optimized on the largest monodisperse polymer studied. However,

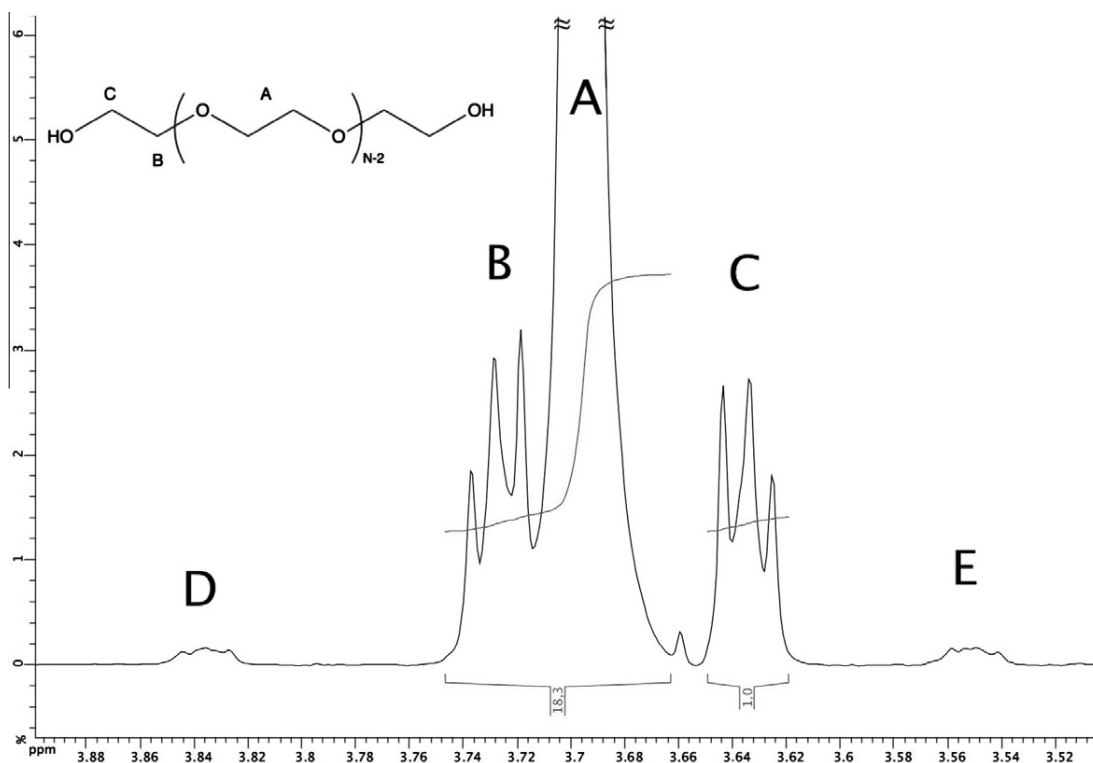


Fig. 1. 1D- ^1H NMR spectrum of a poly-ethyleneoxide in D_2O , mix L. Assignment is given in inset, D and E are the ^{13}C satellites of A.

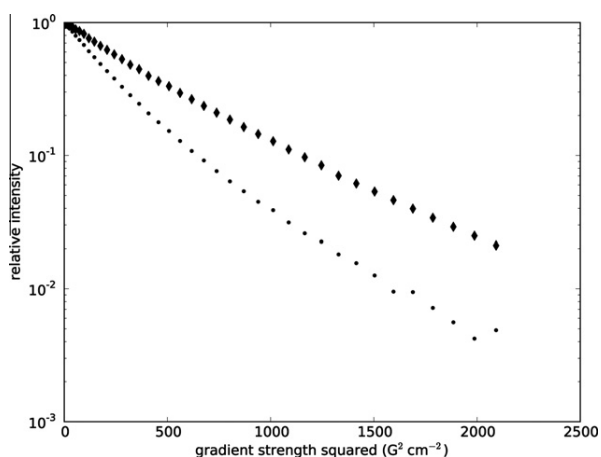


Fig. 2. Log-plot of the observed decays for varying gradient values squared for mix L. Diamonds are from the signal of the main chain (signal A Fig. 1), dots are from the signal of the extremity (signal C).

when the composition of the mix is unknown, one should use large enough PFG intensities to ensure the signal attenuation of the heaviest polymers. As a rule of thumb, a final attenuation around 10% on a monodisperse species is usually required to permit a precise determination of the diffusion coefficient. Thus, when studying an unknown polydisperse polymer, one should try to reach at least a 1% attenuation for the main signal.

Table 1

Experimental results compared to theoretical values.

	N		PDI		M_n (g mol ⁻¹)		M_w (g mol ⁻¹)	
	Theo	Exp	Theo	Exp	Theo	Exp	Theo	Exp
PEO mix								
Mix A	36.3	36.1	1.04	1.06	1615	1588.4	1679.6	1683.7
Mix B	49.4	53.7	1.07	1.08	2190	2362.8	2343.3	2551.8
Mix C	107.5	120	1.11	1.12	4750	5280	5272.5	5913.6
Mix D	8.7	8.7	1.12	1.12	400.6	382.8	447.5	428.7
Mix E	8.8	9.5	1.14	1.17	403.4	418	459.7	489.1
Mix F	23	23.8	1.26	1.31	1021	1047.2	1268.3	1371.8
Mix G	71.5	85.3	1.28	1.28	3165	3753.2	4051.2	4804.1
Mix H	44.8	47.5	1.34	1.15	1989.3	2090	2518	2403.5
Mix I	34.7	37	1.54	1.5	1544.3	1628	2382.7	2442
Mix J	38.1	39.8	2.01	2.2	1696.9	1751.2	3238.5	3852.6
Mix K	15.7	15.9	2.12	1.89	710.3	699.6	1332.1	1322.2
Mix L	19.1	19.4	2.51	2.24	858.5	853.6	2008.2	1912.1
Mix M	21.4	24.8	3.3	2.41	961.7	1091.2	3062.8	2629.8
Mix N	22.4	23.8	3.41	2.75	1001.7	1047.2	3328	2879.8
Mix O	13.5	13.9	5.23	4.48	611.3	611.6	3099.6	2740

Mega-dalton polymers have already been precisely measured on standard spectrometers [3]. So, the main size limitation for the application of this technique is the possibility to reliably detect signals from the chain extremities. Of course, this is more difficult to achieve on large polymers, as the extremity signals might be too faint to be observed. This was done here for PEO polymers up to 10 kDa, despite the fact that this signal only integrates as a CH₂.

The method requires that the extremity of the polymer presents an isolated signal in the NMR spectrum. This condition is not really

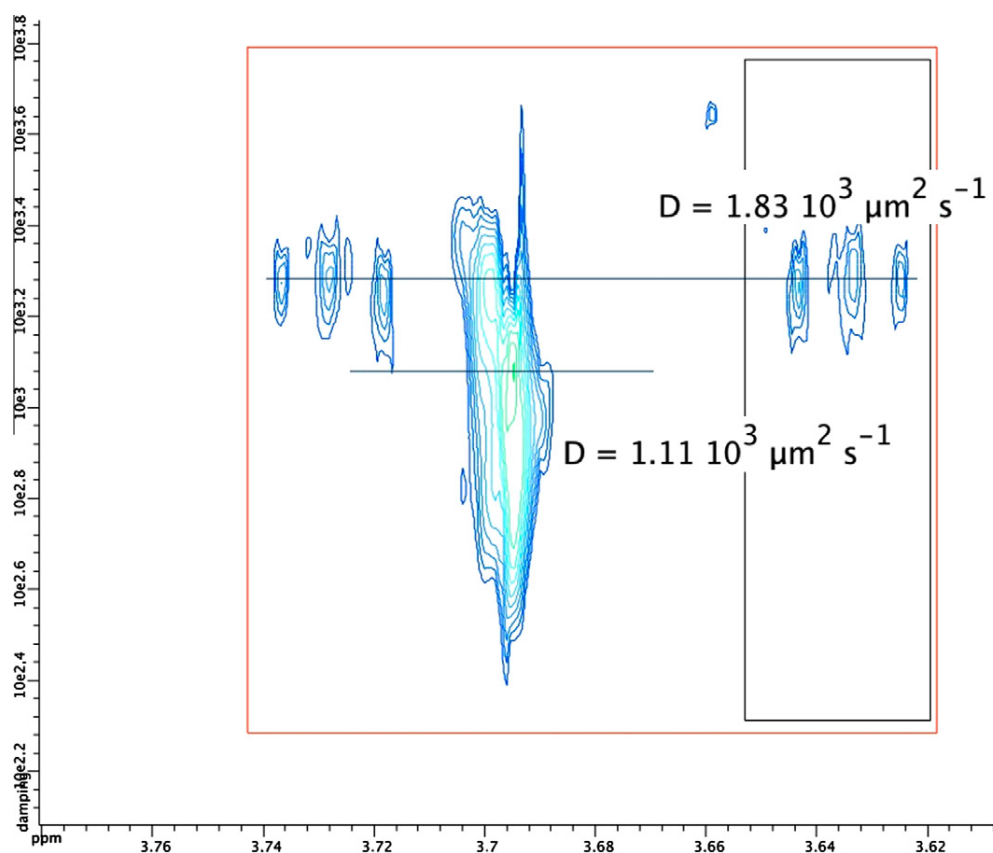


Fig. 3. 2D-DOSY spectrum of mix L. The black rectangle on the right is the region over which the integration is made to determine $\langle D_n \rangle$. $\langle D_w \rangle$ is determined by integration over the whole spectral range shown by outer red rectangle. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

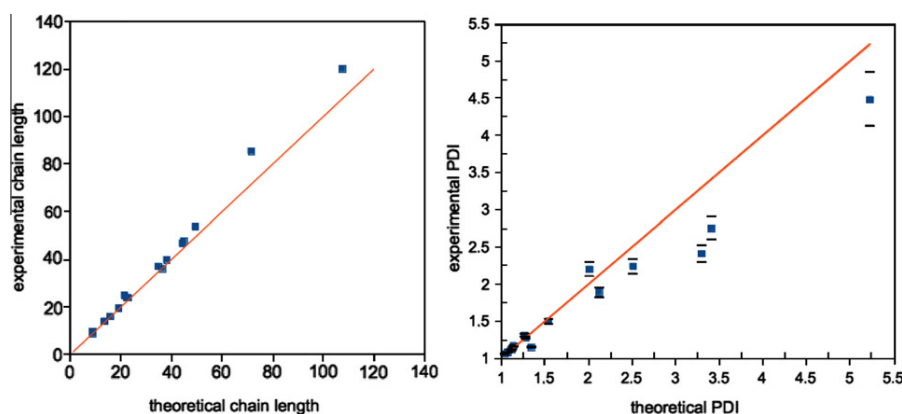


Fig. 4. Correlations curves for the average chain length N (left) and the PDI (right). Red lines correspond to $theo = exp$. The PDI was computed with the fractal dimension value $d_f = 1.86$ (blue square); $d_f = 1.96$ (upper bar); and $d_f = 1.76$ (lower bar). (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

stringent. On the PEO samples, the small shift of 0.08 ppm observed between the chain and the extremity signals, is sufficient for the study. Given this shift difference, two different diffusion coefficient distributions can be extracted by ILT from one 2D-DOSY spectrum. By integrating over the regions displayed in Fig. 3, the barycenters of these distributions are calculated to estimate the PDI.

2.3. Comparison to theoretical values

Table 1 gathers the expected and measured values of N and PDI for all the different analyzed PEO mixes and Fig. 4 shows the comparison between the theoretical and measured values of N and PDI. The very good correlation between theory and measurement indicates that the quality of the method.

The value of the fractal dimension d_f is the only free parameter which is needed to extract the PDI for the 2D-DOSY spectrum. From the Flory theory, it is predicted to be $5/3$ and 3 for fully solvated and collapsed polymer chains, respectively [4]. In a θ solvent, where polymer–polymer interactions are equal to polymer–solvent and solvent–solvent interactions, the polymer behaves as a Gaussian chain and the exponent d_f is predicted to be 2.

Results presented here have been obtained with a d_f value of 1.86, as was determined by several studies [3,9]. Are also added in Fig. 4, points showing the impact of varying the d_f values. It can be observed that while an error on this value may have an impact on the PDI accuracy, this impact is not very important.

3. Conclusion

We have shown that DOSY NMR can bring valuable information on polydisperse polymers. With the proposed approach the polydispersity index as well as average chain length can readily be determined for linear polymers. To assess the polydispersity index from the 2D-DOSY spectra, the barycenter of diffusion peak is calculated, this is made possible here thanks to the ILT analysis of the DOSY signal, which conserves the properties of the polymer distribution [7]. With this approach, results are independent of the average chain length and only the fractal dimension of the polymer chain d_f must be known. Experimental average chain length and polydispersity index did not indicate significative difference when compared to supplier data. This technique was shown to equally reliable and accurate for both high (5.23) and low (1.04) polydispersity indexes. This method requires a separate NMR proton sig-

nal for the extremity of the studied polymer to be observed. However this condition is not stringent, as it was easily fulfilled here in the case of PEO, where only 0.08 ppm separates both signals. It will be easily extended to polymers with different extremity chemical patterns (for example, a methyl- or amide-group). Moreover, in the case of very large polymers with low extremities signals, a chemical modification of the extremities will allow the use of the method presented here.

Compared to other PDI determination technique such as Mass Spectrometry or Size Exclusion Chromatography, this approach presents the unique advantage of a direct measure which does not require any interaction with a static phase, separation, ionization or dilution of the polymer. It does not require any special calibration, equipment, or preparation and is a rapidly obtained with a diluted polymer sample. NMR as always been a powerful spectroscopy for the study of polymers, with DOSY NMR and the proposed procedure, the range of the physico-chemical parameters which can be accessed by NMR is further extended.

4. Experimental

4.1. Sample preparation

A set of 17 PEO standards, with masses ranging from 106 Da to 10,730 Da were purchased from American Polymer Standards Corporation (Mentor, OH, USA). Each standard has been dissolved in Milli-Q water to 10% (w/v) solutions. These solutions were used to create 15 mixes with controlled PDI from 1.04 to 5.23 and a concentration range from 0.05% to 1% (w/v). Each mix contains 10% D_2O (v/v) and 1% (v/v) of a 1 mM DSS (4,4-dimethyl-4-silapentane-1-sulfonic acid) aqueous solution. The details of the 17 standard PEO as well as the 15 mixes are given in the [Supplementary materials](#).

4.2. NMR spectroscopy

$1D-^1H$ and 2D-DOSY experiments were carried out on each PEO mix at 298 K on a 500 MHz Bruker Avance I NMR spectrometer employing a 5 mm TXI probe equipped with z-gradients delivering up to 53 G/cm.

$1D-^1H$ experiments were obtained with presaturation of water, 128 scans of 16k data points, and recycle time of 6.1 s. Fourier transform was applied with zero-filling and 0.5 Hz exponential broadening. Careful spline polynomial correction was applied to each $1D-^1H$ spectra before integration.

2D-DOSY experiments were acquired using a LED experiment with bipolar pulses [10] and water presaturation. Gradients were linearly sampled from 0.5 G/cm to 45.7 G/cm in 40 points. Thirty-two scans were acquired on 16k data points, for a total acquisition time of 1 h and 7 min.

The gradient pulse length was $\delta/2 = 1.5$ ms and the Δ diffusion delay was adapted to the sample for values in the 100–180 ms range. The DOSY spectra were obtained by applying an Inverse Laplace Transform (ILT) along the diffusion axis, using the *Gifa* algorithm [11,12] embedded into the commercial software NMRnotebook (NMRTEC, Illkirch). Careful spline polynomial correction was applied along the F2 dimension before the ILT processing, which was computed on 256 points, using the highest quality available in the algorithm.

4.3. Average chain length determination

For each $1D\text{-}^1H$ spectrum, peaks corresponding to extremity CH_2 protons and chain CH_2 protons were integrated. There are four protons at the extremities and $4N - 4$ protons inside the chain, where N is the number of monomeric units in the polymer chain. The ratio of both integrals allows the average chain length N to be extracted.

4.4. PDI determination

For a given sample, the diffusion coefficient distributions given by the 2D-DOSY spectrum were studied over ranges of chemical shift intervals. Mean diffusion coefficients were computed as a barycenter along the diffusion axis by integrated over determined spectral regions of the 2D spectrum. $\langle D_n \rangle$ was computed as the mean diffusion coefficients measured over the chemical shifts corresponding to the extremity of the chain. $\langle D_w \rangle$ should be evaluated over the whole polymer chain, thus the averaging was performed over a range of chemical shifts, encompassing all polymer signals, main chain and extremities included.

PDI was then obtained using Eq. (5), using a value of d_f equal to 1.86 [3,9]. From the average chain length N , the number average molecular mass M_n was computed using Eq. (3), from the values of PDI and M_n , the mass average molecular mass was determined from $M_w = PDI M_n$.

All the experimental values are given in Table 1. The complete procedure has been programmed into a python script, which can

be embedded as a macro into the NMRnotebook software. The python script of this macro is available in the [Supplementary materials](#).

Acknowledgments

The authors want to thank Marie-Aude Coutouly for her help in developing the NNB macro. J.V. and M.T. also acknowledge NMR-TEC for financial support.

Appendix A. Supplementary material

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.jmr.2011.06.020.

References

- [1] A. Chen, D. Wu, C. Johnson, Determination of molecular-weight distributions for polymers by diffusion-ordered NMR, *J. Am. Chem. Soc.* 117 (1995) 7965–7970.
- [2] D.K. Wilkins, S.B. Grimshaw, V. Receveur, C.M. Dobson, J.A. Jones, L.J. Smith, Hydrodynamic radii of native and denatured proteins measured by pulse field gradient NMR techniques, *Biochemistry* 38 (1999) 16424–16431.
- [3] S. Augé, P.-O. Schmit, C.A. Crutchfield, M.T. Islam, D.J. Harris, E. Durand, M. Clemancey, A.-A. Quoineaud, J.-M. Lancelin, Y. Prigent, F. Taulelle, M.-A. Delsuc, NMR measure of translational diffusion and fractal dimension. Application to molecular mass measurement, *J. Phys. Chem. B* 113 (2009) 1914–1918.
- [4] P. Flory, *Principles of Polymer Chemistry*, Cornell University Press, Ithaca, NY, 1953.
- [5] E.V. Meerwall, Interpreting pulsed-gradient spin-echo diffusion experiments in polydisperse specimens, *J. Magn. Reson.* 50 (1982) 409–416.
- [6] P.T. Callaghan, D.N. Pinder, A pulsed field gradient NMR study of self-diffusion in a polydisperse polymer system: dextran in water, *Macromolecules* 16 (1983) 968–973.
- [7] P. Callaghan, D. Pinder, Influence of polydispersity on polymer self-diffusion measurements by pulsed field gradient nuclear magnetic-resonance, *Macromolecules* 18 (1985) 373–379.
- [8] G. Fleischer, The effect of polydispersity on measuring polymer self-diffusion with the NMR pulsed field gradient technique, *Polymer* 26 (1985) 1677–1682.
- [9] K. Chari, B. Antalek, J. Minter, Diffusion and scaling behavior of polymer-surfactant aggregates, *Phys. Rev. Lett.* 74 (1995) 3624–3627.
- [10] D. Wu, A. Chen, C. Johnson, An improved diffusion-ordered spectroscopy experiment incorporating bipolar-gradient pulses, *J. Magn. Reson. Ser. A* 115 (1995) 260–264.
- [11] M.-A. Delsuc, T. Malliavin, Maximum entropy processing of DOSY NMR spectra, *Anal. Chem.* 70 (1998) 2146–2148.
- [12] D. Tramesel, V. Catherinot, M.-A. Delsuc, Modeling of NMR processing, toward efficient unattended processing of NMR experiments, *J. Magn. Reson.* 188 (2007) 56–67.

II.7 Conclusion

Cette étude de polymères linéaires par mesures de diffusion démontre l'intérêt de la RMN pour la détermination de l'indice de polydispersité. Nous avons montré la possibilité de déterminer certaines caractéristiques des polymères à l'aide de spectres RMN. Les mesures à une dimension donnent accès aux longueurs de chaîne des polymères, tandis que les expériences à deux dimensions telles que la DOSY nous donnent accès à l'indice de polydispersité. Pour obtenir l'IP à partir de spectres 2D DOSY, le barycentre du pic de diffusion est mesuré, ceci est rendu possible par l'analyse par ILT du signal de DOSY [Callaghan 1985]. Cette approche est indépendante de la longueur moyenne de chaîne, seule la dimension fractale du polymère doit être connue. Les résultats de longueur de chaîne et d'indice de polydispersité ne montrent pas de différence significative avec les valeurs expérimentales des fournisseurs de polymères. Cette technique est aussi bien adaptée aux polymères à faibles IP (1,04) que pour les polymères à fort IP (5,23). La méthode nécessite cependant un signal proton de l'extrémité de chaîne séparé de ceux du polymère, mais cette condition n'est pas stricte, puisqu'ici une différence de seulement 0,08 ppm a été suffisante pour déterminer IP. Ceci pourra être facilement étendu à des polymères possédant des groupements chimiques spécifiques aux extrémités, tels que groupements méthyle ou amides par exemple. Et pourra également être appliqué dans le cas de polymères lourds possédant un faible signal proton extrême.

En comparaison avec d'autres méthodes de mesure de l'indice de polydispersité, tels la Spectrométrie de Masse ou la Chromatographie d'Exclusion Stérique, cette approche présente l'avantage d'être une mesure directe. L'échantillon ne subit pas d'interaction avec une phase stationnaire, ni de séparation ou d'ionisation par exemple. Aucune calibration n'est nécessaire avant toute mesure, ni installation de matériel spécifique sur le spectromètre à RMN. La préparation de l'échantillon est simple et rapide. La RMN étant une méthode spectroscopique de choix pour l'étude des polymères, celle-ci devient plus élargie grâce à la mesure de l'indice de polydispersité par DOSY.

Bibliographie

- [Augé 2009] Augé S., Schmit P.O., Crutchfield C.A., Islam M.T., Harris D.J., Durand E., Clemancey M., Quoineaud A.A., Lancelin J.M., Prigent Y., Taulelle F. et Delsuc M.A. *NMR Measure of Translational Diffusion and Fractal Dimension. Application to Molecular Mass Measurement*. J. Phys. Chem. B, vol. 113, no. 7, 2009. (Cité en page 11.)
- [Auguin 2004] Auguin D., Gostan T., Delsuc M.A. et Roumestand C. *Détermination de l'état d'oligomérisation du domaine homologue à la pleckstrine de la protéine AKT2 par des techniques RMN*. CR Chimie, vol. 7, no. 3-4, 2004. (Cité en page 11.)
- [Balayssac 2009] Balayssac S., Gilard V., Delsuc M.A. et Malet-Martino M. *DOSY NMR, a new tool for fake drug analyses*. Spectrosc Eur, vol. 21, no. 3, 2009. (Cité en page 10.)
- [Callaghan 1985] Callaghan P.T. et Pinder D.N. *Influence of Polydispersity on Polymer Self-Diffusion Measurements by Pulsed Field Gradient Nuclear Magnetic Resonance*. Macromolecules, vol. 18, no. 3, 1985. (Cité en page 25.)
- [Chari 1995] Chari K., Antalek B. et Minter J. *Diffusion and Scaling Behavior of Polymer-Surfactant Aggregates*. Phys. Rev. Lett., vol. 74, 1995. (Cité en page 11.)
- [Chen 1995] Chen A., Wu D., S C. et Johnson, Jr. *Determination of Molecular Weight Distributions for Polymers by Diffusion-Ordered NMR*. J Am Chem Soc, vol. 117, 1995. (Cité en page 11.)
- [Cohen 2005] Cohen Y., Avram L. et Frish L. *Diffusion NMR Spectroscopy in Supramolecular and Combinatorial Chemistry : An Old Parameter ? New Insights*. Angew. Chem. Int. Ed, vol. 44, no. 4, 2005. (Cité en page 10.)
- [Crutchfield 2007] Crutchfield C.A. et Harris D.J. *Molecular mass estimation by PFG NMR spectroscopy*. J Magn Reson, vol. 185, no. 1, 2007. (Cité en page 11.)
- [Delsuc 1998] Delsuc M.A. et Malliavin T.E. *Maximum Entropy Processing of DOSY NMR Spectra*. Anal. Chem., vol. 70, 1998. (Cité en page 9.)
- [Gostan 2004] Gostan T., Tramesel D., Brun E., Prigent Y. et Delsuc M.A. *L'expérience DOSY, une puissante méthode RMN pour l'analyse de mélanges complexes et la détection de traces*. Spectra Analyse, vol. 240, no. 240, 2004. (Cité en page 10.)
- [Li 2012] Li W., Chung H., Daeffler C., Johnson J.A. et Grubbs R.H. *Application of 1H DOSY for Facile Measurement of Polymer Molecular Weights*. Macromolecules, vol. 45, no. 24, 2012. (Cité en page 10.)
- [Maina 2014] Maina N.H., Pitkänen L., Heikkinen S., Tuomainen P., Virkki L. et Tenkanen M. *Challenges in analysis of high-molar mass dextrans : Comparison of HPSEC, AsFIFFF and DOSY NMR spectroscopy*. Carbohydr Polym, vol. 99, 2014. (Cité en page 11.)

- [Morris 1992] Morris K.F., Johnson C.S. et Jr. *Diffusion-Ordered Two-Dimensional Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy*. J. Am. Chem. Soc, vol. 114, 1992. (Cité en pages 3 et 9.)
- [Stejskal 1965] Stejskal E.O. et Tanner J.E. *Spin Diffusion Measurements : Spin Echoes in the Presence of a Time-Dependent Field Gradient*. J. Chem. Phys., vol. 42, no. 1, page 288, 1965. (Cité en page 7.)
- [Tanner 1970] Tanner J.E. *Use of the Stimulated Echo in NMR Diffusion Studies*. J. Chem. Phys., vol. 52, no. 5, page 2523, 1970. (Cité en page 8.)
- [Viel 2003] Viel S., Capitani D., Mannina L. et Segre A. *Diffusion-Ordered NMR Spectroscopy : A Versatile Tool for the Molecular Weight Determination of Uncharged Polysaccharides*. Biomacromolecules, vol. 4, no. 6, 2003. (Cité en page 11.)
- [Wilkins 1999] Wilkins D.K., Grimshaw S.B., Receveur V., Dobson C.M., Jones J.A. et Smith L.J. *Hydrodynamic Radii of Native and Denatured Proteins Measured by Pulse Field Gradient NMR Techniques*. Biochemistry, vol. 38, no. 50, 1999. (Cité en page 11.)
- [Wu 1995] Wu D., Chen A. et Johnson C.S. *An improved Diffusion-Ordered Spectroscopy Experiment Incorporating Bipolar-Gradient Pulses*. J Magn Reson, Serie A, vol. 115, 1995. (Cité en page 10.)

Annexes

Standards et mélanges de PEO

PEO	IP	M_n	M_w
106	1	106	106
350	1.1	320	352
400	1.1	385	423.5
425	1.08	395	426.6
450	1.09	415	452.4
610	1.11	580	643.8
985	1.04	955	993.2
1050	1.06	1000	1060
1500	1.05	1425	1496.3
1670	1.04	1615	1679.6
2010	1.04	1965	2043.6
2200	1.07	2190	2343.3
3300	1.28	3165	3386.6
3770	1.06	3580	3794.8
5250	1.11	4750	5272.5
10225	1.05	10125	10631.3
10730	1.04	10300	10712

TABLE A.1 – Table des standards PEO utilisés et analysés par RMN. M_n , IP et M_w sont les données du fournisseur.

	mix E	mix I	mix D	mix H	mix J	mix F	mix L	mix N	mix M	mix O	mix K	mix A	mix B	mix C	mix G
PEO	n_i	n_i	n_i	n_i	n_i	n_i	n_i	n_i	n_i	n_i	n_i	n_i	n_i	n_i	n_i
106										50					
350	1.37		1.31		1		20	20	20	20	20				
400	1.13		2.17												
425	1.13		3.23												
450	1.06		2.03		1	1	14	14	14	14	14				
610	0.75		0.71		1	2	10	10	10	10	10				
985	1.04	3.32			1	3	7	7	7	7	7				
1050	1.06	3.11		2.85											
1500	1.05	2.2		4.04	1	2	5	5	5	5	4				
1670	1.04	1.96		5.4								1			
2010	1.04			5.92	1	1	3.5	3.5	3.5	3.5	3				
2200	1.07											1	1		
3300	1.28			2.68	1		2.5	2.5	2.5	2.5	2				1
3770	1.06	0.87		1.59											
5250	1.11	0.63		0.57	1		1.7	1.7	0.8	1.7				1	
10225	1.05							1							
10730	1.04									1					
N	8.8	34.7	8.7	44.8	38.1	23	19.1	22.4	21.4	13.5	15.7	36.3	49.4	107.5	71.5
M_n théo	403.4	1544.3	400.6	1989.3	1696.9	1021	858.5	1001.7	961.7	611.3	710.3	1615	2190	4750	3165
M_w théo	459.7	2382.7	447.5	2518	3238.5	1268.3	2008.2	3328	3062.8	3099.6	1332.1	1679.5	2343.3	5272.5	3386.6
IP théo	1.14	1.54	1.12	1.34	2.01	1.26	2.51	3.41	3.3	5.23	2.12	1.04	1.07	1.11	1.28
IP exp	1.17	1.5	1.12	1.15	2.2	1.31	2.24	2.75	2.41	4.48	1.89	1.06	1.08	1.12	1.28

TABLE A.2 – Table des mélanges de PEO réalisés et analysés par RMN, voir détails en page suivante.

n_i représente la quantité molaire du PEO correspondant dans le mélange. Dans chaque mélange est ajouté 10% D₂O (v/v) et 1% de solution de DSS (4,4-diméthyl-4-silapentane-1-sulfonic acid) à 1 mM. Les lignes M_n théo et M_w théo correspondent au calcul théorique de la masse moléculaire moyenne en nombre et de la masse moléculaire moyenne en masse, respectivement pour le mélange considéré en fonction de la quantité de PEO introduite. N correspond au calcul de la longueur de chaîne à partir de n_i et M_n théorique. La ligne suivante, IP théo est déterminé à l'aide des valeurs théoriques de M_n et M_w . Et enfin, la dernière ligne regroupe les valeurs d'IP expérimentaux.

Macro en python pour la détermination de l'IP sur NMRnotebook

```
#!/usr/bin/env python
# encoding: utf-8
"""
Created by Marie-Aude Coutouly, Justine Vieville, Matthieu ...
...Tanty and Marc-Andre Delsuc on 2010-11-04
Copyright (c) 2010 NMRTEC and IGBMC. All rights Reserved.

Macro that enables to calculate the barycenter of a given ...
...rectangle of a 2D spectra

"""
import nmrtec.nmrNotebook.controller.Controller as Cont
import nmrtec.util as util
import nmrtec.nmrNotebook.model.common.nmrCommon as nmrcom

class Barycentre:
    """
    computes the barycenter of each
    defined rectangle and deduces the
    polydispersity index of the solution
    """
    def __init__(self):
        """
        initializes and get the integration coordinates
        """
        df=1.86 #to be...
        ... changed for each type of molecule

    from NNB_lib import DialogText, ...
        ...listOfRectangles
    self.data = NNB.loadCurrentData()
    if ( get_dim() != 2 ):
        self.die("To be applied on 2D only")
    if len(listOfRectangles()) == 1 :
        self.die("You must add a rectangle to ...
        ...define a zoom region.")
```

```

if len(listOfRectangles()) > 2 :
    self.die("expected two zoom region. %d ...
            ...zoom regions were defined." % len(...
            ...listOfRectangles()))

for i in [0,1]:
    indexRect = listOfRectangles()[i]
    dim(2)
    self.F1_Left = int(indexRect[0])
    self.F1_Right = int(indexRect[2])
    self.F2_Left = int(indexRect[1])
    self.F2_Right = int(indexRect[3])
    if i==0 :
        b = self.pointToDamping(self....
            ...barycenter())
        b = b**(-df)
    else:
        a = self.pointToDamping(self....
            ...barycenter())
        a = a**(-df)

    ip=a/b
    if ip < 1.0:
        ip= 1/ip

    result="polydispersity index : %s " %ip
    DialogText("Resultat", result)

#...
...
...
def pointToDamping(self ,value ):
    """
    pointToDamping converts points units into ...
    ...diffusion units
    """
    c = Cont.getCurrentControllerDeDocument()
    fold = c.getCurrentNMR_Folder()
    nsa = fold.getNNB_NMR_Spectrum().getAxisF(1)
    print value
    new_damping = util.NMR_UnitToolkit....
        ...pointToUnit(nmrcom.NMR_Unit.UNIT_DAMPING,...
        ...nsa , value)

    return new_damping

#...
...
...
def barycenter(self):

```

```

"""
realize the integration over the integration ...
...zones (obtained at initialization)
"""
#initialisation du databuffer a zero
dim(1)
zero()
put("data")
# on met la premiere colonne
dim(2)
col(int(self.F2_Left))
dim(1)
put("data")
for column in range(self.F2_Left+1,self...
...F2_Right+1):
    dim(2)
    col(int(column))
    dim(1)
    adddata()
    put("data")

dim(1)
get("data")
m=0
n=0
for i in range(self.F1_Left , self.F1_Right+1):
    m += float(valld(i))*i
    n += float(valld(i))

b = m/n
return b

# then execute
Barycentre()

if __name__ == "__main__":
    try:
        Barycentre()
    except:
        from NNB_lib import alert , formatExceptionInfo
        try:
            alert(formatExceptionInfo())
        except:
            raise "should never happen"

```

FIGURE B.1 – Détail de la macro utilisée pour le calcul de l'indice de polydispersité au sein du logiciel NMRnotebook

Etude d'Acides Nucléiques Peptidiques

Sommaire

III.1 Introduction sur les Acides Nucléiques Peptidiques	35
III.1.1 Principe et description des PNA	35
III.1.2 Les différents PNA analysés	39
III.1.3 Température de fusion et stabilité des PNA en solution	42
III.2 Le DINAMelt Web Server	42
III.3 Analyse des PNA par RMN	45
III.3.1 Expériences RMN à une dimension	45
III.3.2 Expériences RMN à deux dimensions	49
III.3.3 Variation de température suivie par RMN	51
III.3.4 Interprétation des spectres RMN des PNA	53
III.4 Mesures biophysiques additionnelles	76
III.4.1 Hyperchromicité, température de fusion et structure secondaire	76
III.4.2 Mesures de Dichroïsme Circulaire	77
III.4.3 Analyse de la structure secondaire	79
III.5 Conclusion	85
Bibliographie	87

III.1 Introduction sur les Acides Nucléiques Peptidiques

III.1.1 Principe et description des PNA

Les Acides Nucléiques Peptidiques (Peptide Nucleic Acids, PNA), ou Acides Nucléiques Polyamides sont des oligonucléotides non naturels synthétisés dès les années 1991 [Nielsen 1991]. Les PNA sont des molécules chimiques mimétiques des nucléotides (ADN ou ARN).

Le squelette sucre-phosphate de l'ADN (ou ARN) chargé négativement est remplacé par un squelette neutre composé d'une répétition d'unités N-(2-aminoéthyl)glycine reliés par une liaison peptide, voir figure III.1. Un PNA porte sur son squelette les bases puriques Adénine et Guanine ainsi que les bases pyrimidiques Thymine et Cytosine, liées par liaisons carbonyle méthylène. Les squelettes

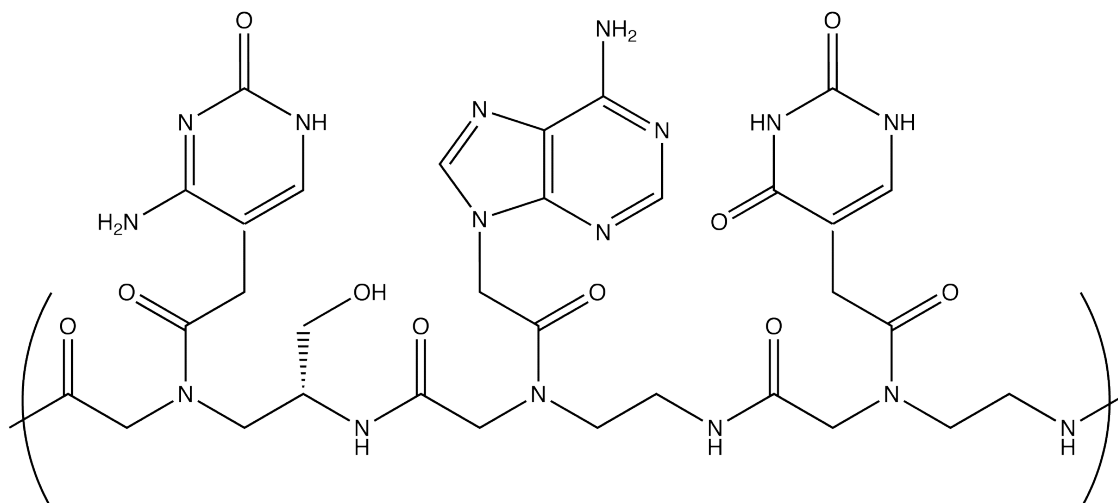


FIGURE III.1 – Représentation schématique d'un Acide Nucléique Peptidique, exemple de squelette avec trois nucléobases.

de l'ADN et des PNA sont comparés en annexe C.1. La répartition spatiale des nucléobases et les distances intramoléculaires au sein d'un PNA sont similaires à ceux de l'ADN.

A l'aide de modélisations moléculaires, les PNA sont développés en tant que ligands de reconnaissance de la double hélice α de l'ADN [Nielsen 1999b]. Ainsi, les bases présentes sur les PNA accordent la reconnaissance de séquences d'ADN ou d'ARN spécifiques. Les hybridations PNA/ADN ou PNA/ARN [Achim 2007] sont favorisées par liaisons hydrogène et empilement de nucléobases ("Stacking").

Le squelette neutre du PNA lui confère une meilleure stabilité thermique lorsqu'il est en duplexe avec l'ADN (par comparaison aux duplexes ADN/ADN). Ils présentent une meilleure spécificité en se liant à l'ADN complémentaire [Demidov 2004]. Du fait de leur squelette neutre, l'hybridation des PNA n'est pas dépendante de la force ionique du solvant (ce qui n'est pas le cas de l'ADN). Ils sont stables dans une large gamme de température et de pH, cependant leur solubilité dans l'eau est limitée [Uhlmann 1998].

Du fait de leur propriétés de liaison à l'ADN complémentaire, les PNA présentent un intérêt majeur en biologie moléculaire. Les applications des PNA sont réparties en plusieurs catégories : biocapteur de l'acide nucléique [Kuhn 2001], outil de diagnostic et détection (utilisation de PNA fluorescents) [Stender 2003], outil en biologie moléculaire et génomique fonctionnelle [Demidov 2001], [Winssinger 2012], [Kazane 2013], agent thérapeutique [Nielsen 1999a].

Les PNA présentés ci après, sont synthétisés par "click" cycloadditions [Chouikhi 2010] par Nicolas Winssinger et son équipe, au Laboratoire de Chimie Organique et Bio-Organique de Strasbourg.

Ce travail sur les PNA est un travail préliminaire, actuellement en cours. Les résultats peuvent sembler peu ordonnés du fait de leur complexité et du manque de résultats sur certains PNA.

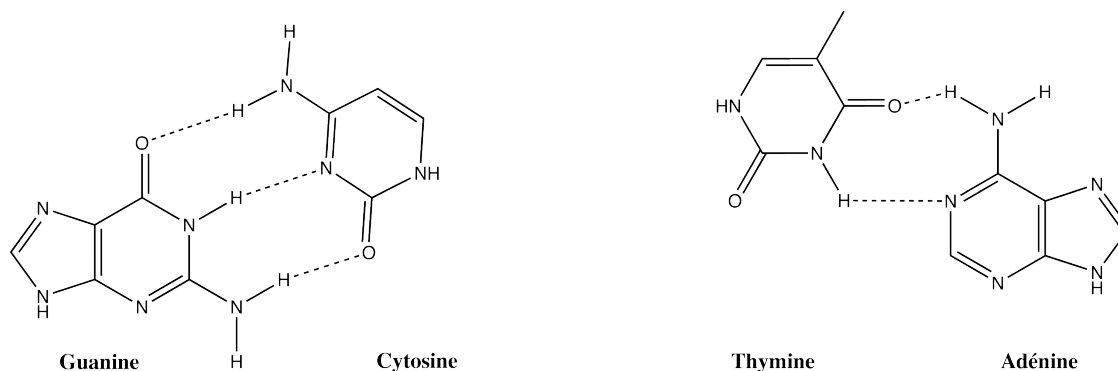


FIGURE III.2 – Représentation schématique d'un appariement de type Watson-Crick entre les bases A-T et G-C.

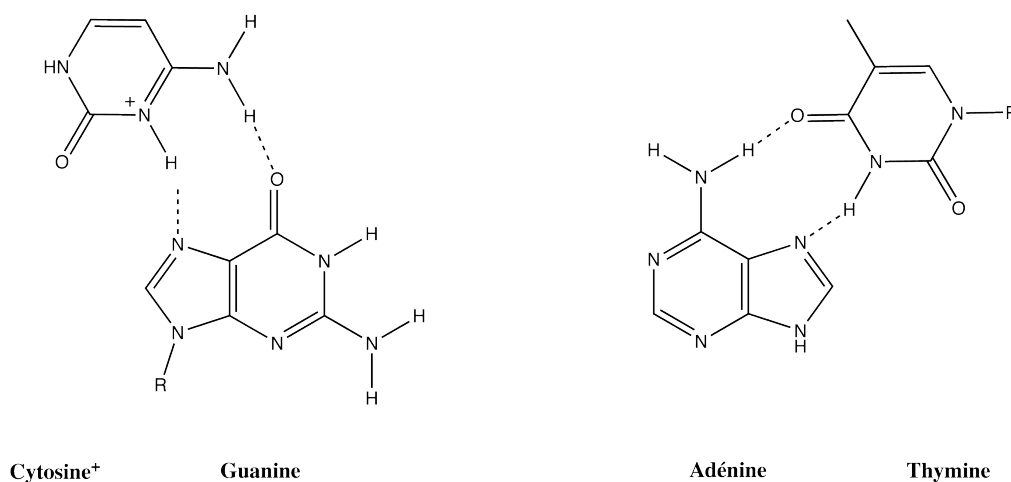


FIGURE III.3 – Représentation schématique d'un appariement de type Hoogsteen entre les bases A-T et G-C⁺. Par comparaison aux liaisons Watson-Crick, une autre face de la purine est engagée dans la liaison hydrogène.

III.1.1.1 Utilisation des PNA en biologie moléculaire

Les PNA sont des composés très stables biochimiquement et ne sont pas sensibles au clivage par les enzymes nucléase ou protéase. L'absence de charges négatives du squelette polyamide du PNA évite la répulsion coulombienne des charges entre le PNA et l'ADN (ou ARN) et permet la formation d'hybridations de forte affinité. Cette absence de répulsion électrostatique entre voisins du squelette du PNA, favorise également la formation d'aggrégats des PNA seuls en solution. Ces propriétés d'affinité sont utilisées afin de créer des complexes des PNA avec l'ARN et l'ADN par formation de liaisons Watson-Crick, Hoogsteen et Wobble entre les bases nucléiques de chaque acteur [Faccini 2008]. Les figures III.2, III.3 et III.4 schématisent les différentes liaisons possibles entre les nucléobases d'un PNA et les brins d'ADN ou d'ARN.

Les PNA peuvent former des triplexes avec l'ADN par stacking [Armitage 2003], voir figure III.5. Il se forme des liaisons Watson-Crick d'un côté de l'hélice et des

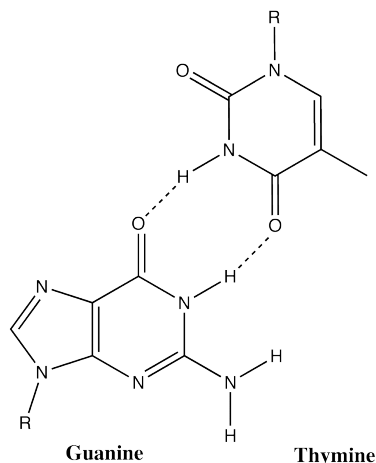


FIGURE III.4 – Représentation schématique d'un appariement de type Wobble entre les bases T et G.

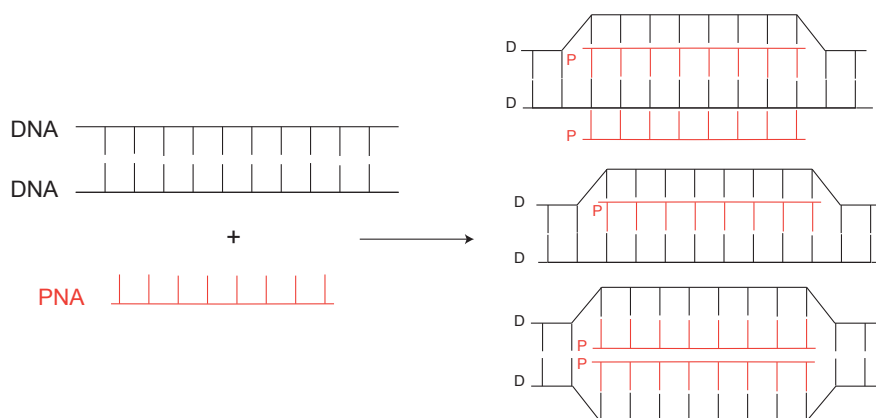


FIGURE III.5 – Représentation schématique des hybridations possibles entre une ou plusieurs molécules de PNA et deux brins d'ADN.

liaisons Hoogsteen de l'autre côté de l'hélice α de l'ADN. De plus, les PNA forment des duplexes avec l'ARN. Ces différents complexes ayant le potentiel de régulation de l'expression génique, ils sont appliqués aux stratégies anti-sens (ARN, blocage d'un facteur de transcription) et anti-gènes (ADN, blocage d'un gène) à des fins clinique [Koh], voir annexe D.1.

III.1.1.2 Exemples de PNA et chiralité : les gamma-PNA

Les PNA tels que décrits ci-dessus ne possèdent pas de conformation structurale définie en solution. Contrairement à l'ADN ou l'ARN qui possèdent une conformation en hélice en partie due à la présence de centres chiraux sur le squelette. Afin d'éviter les agrégations, et obtenir une conformation structurale, les PNA ont été structurellement modifiés par ajout d'un centre chiral sur le squelette. En incluant un centre de chiralité sur le squelette du PNA, la formation d'hélice droite ou gauche a été engendrée [Dragulescu-Andrasi 2006], créant alors une augmentation

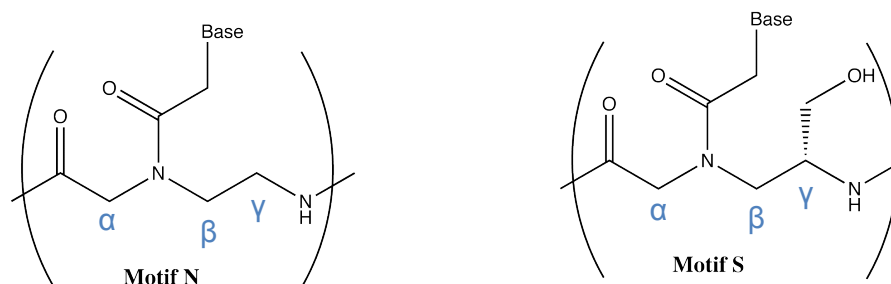


FIGURE III.6 – Représentation du squelette peptidique des PNA utilisés dans cette étude. Motif N : squelette neutre non chiral. Motif S : squelette d'un γ -PNA avec la présence d'une pseudo sérine

dans l'efficacité d'hybridation des PNA à l'ADN. Parmi les substitutions relatées dans la littérature, les substitutions sur les positions α et γ sont les plus communes. Mais il en existe d'autres types. Les substitutions par une L-Sérine sur la position γ du PNA, représentée en figure III.6, concernent une partie des PNA de cette étude [He 2010].

III.1.2 Les différents PNA analysés

Pour cette étude de PNA, différents types sont analysés. Neuf échantillons de PNA avec le squelette de motif N, voir figure III.6 et quatre échantillons de γ -PNA présentant le motif S sur le squelette ont servi pour les diverses études structurales. Les PNA étudiés sont représentés de manière schématique selon les figures III.7 et III.8. Les formules topologiques et semi-développées des différents PNA sont quant à elles représentées en annexe E.1 et E.2.

Les PNA 1, 2, 3 et 4, présentés en figure III.7, sont des PNA présentant peu de bases nucléiques, et un squelette peptidique court.

Les PNA 4, 5 et 6 sont des γ -PNA avec insertion de trois pseudosérines pour le PNA 4, et cinq pseudosérines sur les PNA 5 et 6. Le PNA 10 est un duplex formé à partir des PNA 5 et 6. Les molécules 1 à 6 et 10 sont présentés schématiquement en figure III.7. A la fin de chaque molécule de PNA sont présents deux acides aminés, ici deux acides glutamiques (Glu).

Une série de PNA plus complexes est aussi étudiée, les PNA sont présentés figure III.8. Le PNA 7 est un PNA similaire au PNA 5, il présente le même enchaînement de bases nucléiques, néanmoins, il ne présente pas de pseudosérines et les acides aminés terminaux sont différents. Les PNA 8 et 9 sont des PNA ramifiés comportant trois branches dont deux branches identiques et pouvant se lier à trois PNA linéaires. Le PNA 7 est synthétisé afin de s'apparier avec deux brins de 8 et deux brins de 9. Les PNA 8 et 9 sont synthétisés afin de s'apparier en hétéroduplexes 11 et 12. Ces hétéroduplexes s'assemblent ensuite pour former le triplex 13.

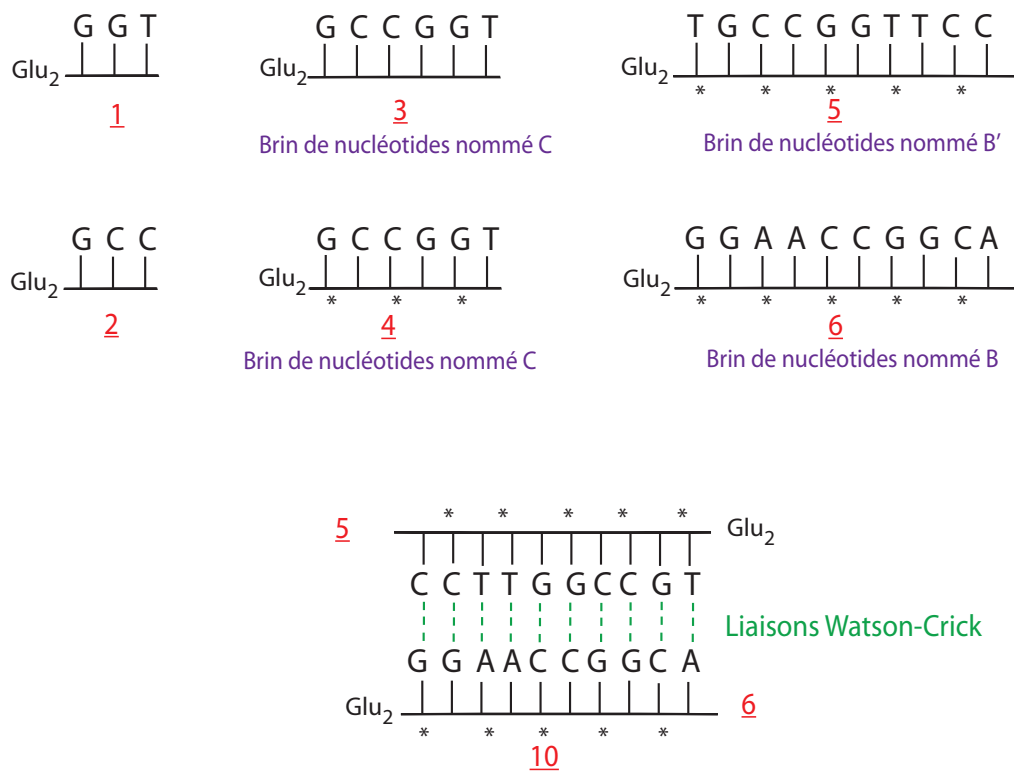


FIGURE III.7 – Représentation schématique des PNA 1, 2, 3, 4, 5, 6, et 10 dont les bases nucléiques présentes sur le squelette sont détaillées. Les étoiles indiquent la position des pseudo-sérines. Est aussi représenté la notation utile pour le DINAMelt Web Server, voir plus loin.

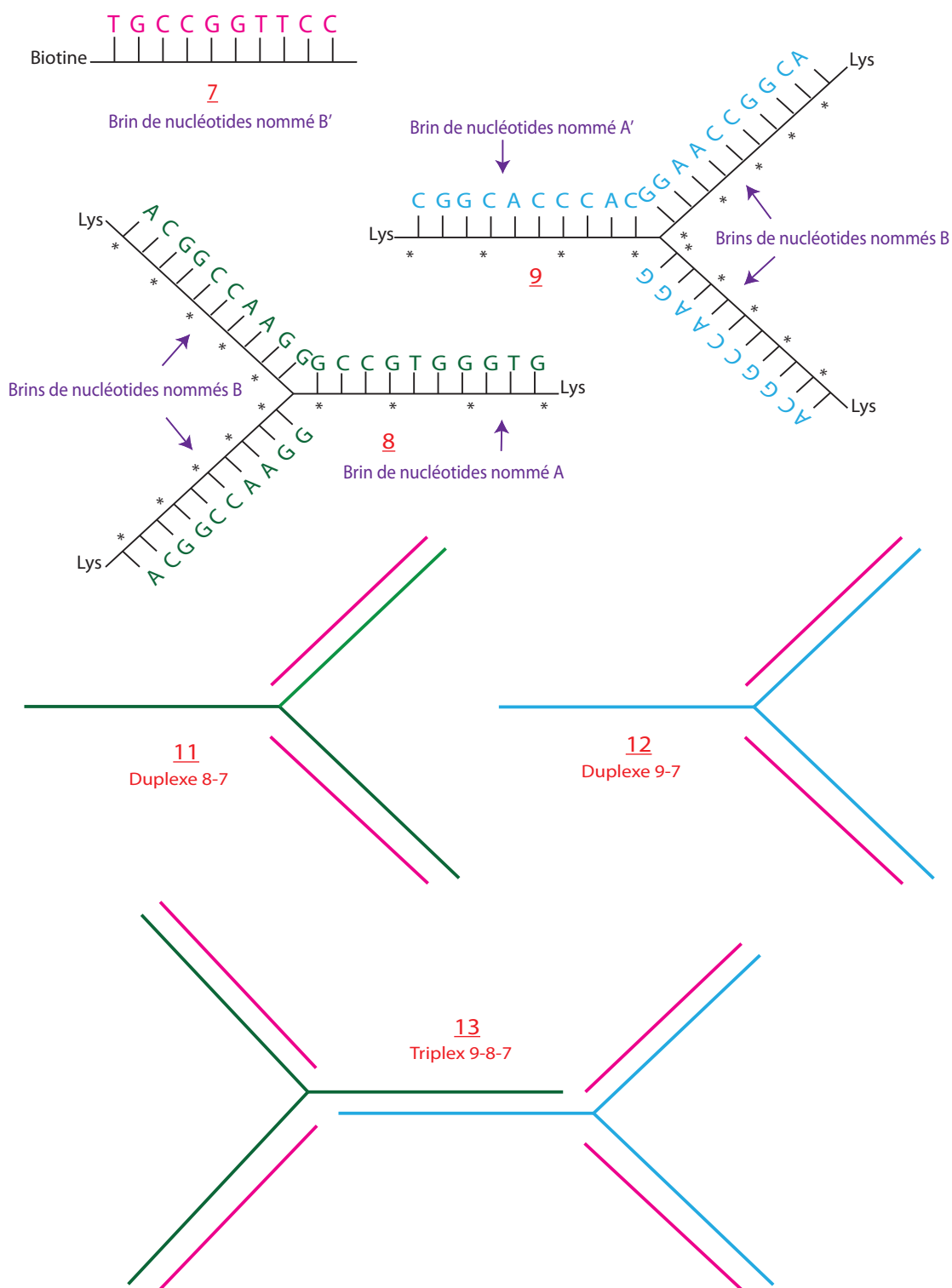


FIGURE III.8 – Représentation schématique des six premiers PNA analysés. Les PNA 8 et 9 sont des PNA ramifiés. Ils forment avec le PNA 7 les duplexes 11 et 12. Le triplex 13 est formé à partir des deux duplexes 11 et 12. Est aussi représenté la notation utile pour le DINAMelt Web Server, voir plus loin.

III.1.3 Température de fusion et stabilité des PNA en solution

Les PNA ne présentent pas de problèmes particuliers de solubilité à la concentration à laquelle ils sont utilisés en RMN pour cette étude (de 80 μ M à 2 mM). Ils sont solubles dans l'eau, en milieu acide, et par ajout de DMSO en milieu basique. Comme expliqué en partie III.1.1, les PNA ont la capacité à former des liaisons Watson-Crick, Hoogsteen et Wobble. Ces liaisons, entre les bases nucléiques G-C et A-T (Watson Crick ou Hoogsteen) et T-G (Wobble), ne possèdent pas les mêmes propriétés. En effet les liaisons G-C et A-T sont plus fortes que les liaisons T-G. Elles sont plus stables et donc plus résistantes à la température. En cas d'élévation de la température, ce sont alors les liaisons T-G qui céderont les premières. Les liaisons Hoogsteen ne seront pas discriminées dans cette étude. Elles sont probablement peu présentes du fait de leur stabilité moindre par rapport aux liaisons Watson-Crick au vue des séquences de PNA étudiées. Mais elles peuvent aussi être présentes lors de formation d'hairpin par l'encombrement stérique.

Les PNA peuvent former, par le biais de ces différents types de liaisons, des homodimères de type linéaires, ou se replier. Ils prennent alors une conformation dite "hairpin" ou le PNA se referme sur lui même afin de former une boucle (ou épingle à cheveux).

En raison de la flexibilité de leur squelette peptidique, les PNA seront considérés comme ayant un comportement similaire à celui de l'ARN en solution.

III.2 Le DINAMelt Web Server

En plus de posséder la faculté de s'hybrider à des brins d'ADN ou d'ARN, les PNA peuvent s'hybrider entre eux (formation de duplexes ou triplexes) ou s'autohybrider. Afin de prédire les appariements possibles des PNA entre eux, nous allons nous aider d'un site web, le DINAMelt Web Server (Di-Nucleic Acid hybridization and Melting prediction), voir annexe F.1. Ce site, créé en 2005 par Nicholas R. Markham, est un outil de prédiction d'appariements d'acides nucléiques, et de température de fusion de brins d'ADN ou d'ARN. Pour l'étude de structure secondaire des PNA, nous allons détourner ce serveur de son usage. La température de fusion est le point pour lequel la moitié des acides nucléiques sont dissociés (ou associés). Plus l'acide nucléique est long, plus sa dénaturation sera difficile, il sera donc résistant à la chaleur. Inversement plus un acide nucléique sera court, plus sa température de fusion sera faible. Tout comme l'outil de prédiction de structure, nous détournons l'usage de cet outil de simulation de température de fusion d'ADN ou ARN afin d'obtenir une estimation de celle de nos PNA. Pour cela nous allons nous placer en configuration ADN puis ARN, (où les appariements T-G sont autorisés) afin d'observer les appariements et températures de fusion prédits par le DINAMelt Web Server.

Prenons comme exemple la molécule 5. L'enchaînement des bases nucléiques est le suivant : TGCCGGTTCC. En choisissant l'onglet "Two state melting hybridization" nous pouvons entrer cette enchaînement de bases nucléiques dans le Web Server

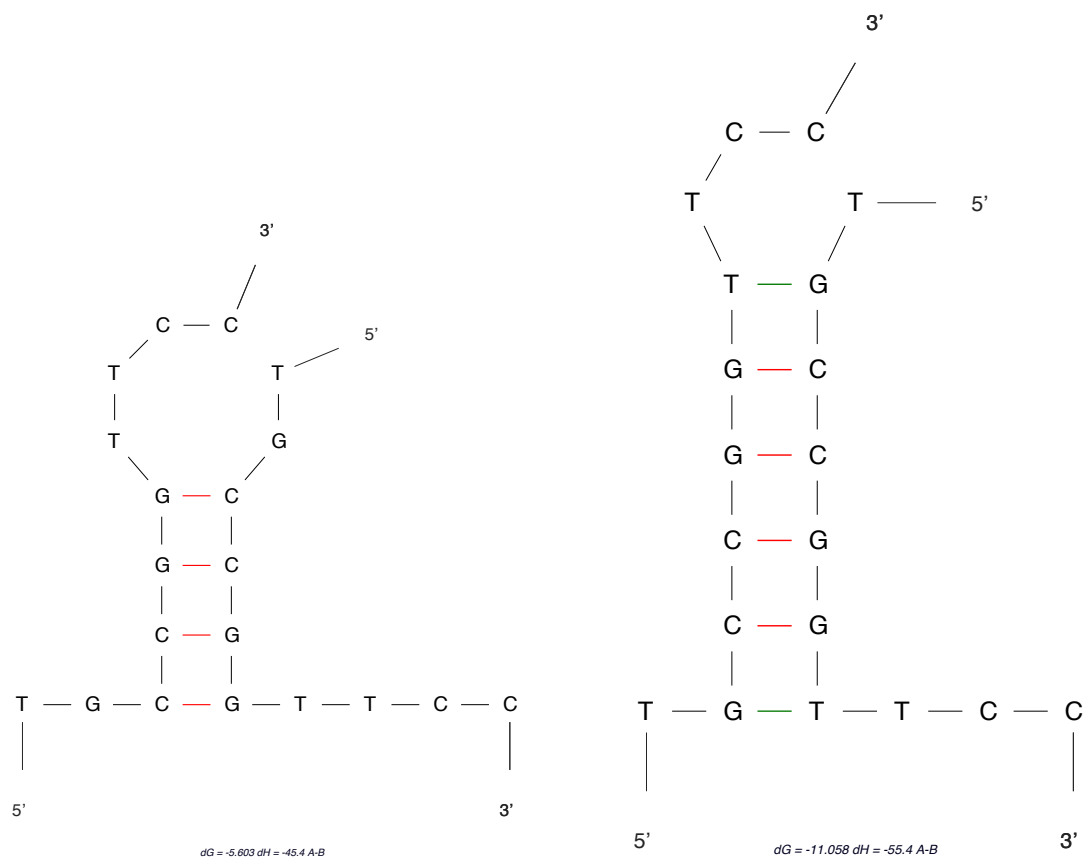


FIGURE III.9 – Représentation issue du DINAMelt Web Server pour l’homodimérisation du PNA 5 sur lui-même en solution. Comportement simulé semblable à l’ADN pour la figure de gauche et assimilé à un comportement ARN pour la figure de droite (paires T-G appariées). Température de fusion théorique : 35,4°C en comportement ADN, et 50,9°C en comportement ARN.

et obtenir une simulation d’homo-appariement du PNA 5 en solution sur lui-même (voir annexe F.3). Plusieurs options s’offrent à nous, telles que le type d’ions présents en solution (ions sodium ou magnésium et leur concentration, température ou encore le choix du comportement de type ADN ou ARN). Nous considérons dans un premier temps que le PNA possède un comportement proche de l’ADN, et la température à choisir lors de la simulation est fixée à 25°. Cet exemple est présenté en figure III.9 motif de gauche. Si l’on considère un comportement semblable à un brin d’ARN, nous obtenons le dimère présenté figure III.9 de droite. Le serveur nous fournit deux duplexes dont un possédant plus de liaisons hydrogènes impliquées dans un appariement, celui de la simulation de type ARN. Comme l’ADN ne permet pas les appariements de type Wobble, il est normal de ne pas retrouver les paires T-G ici dans la figure de gauche. En revanche elles apparaissent dès lors que nous choisissons l’option ARN. Les comportements sont très différents, il est donc important de choisir la bonne option dans le DINAMelt Web Server.

Dans la partie suivante (III.3.1.2), l’expérience de RMN va nous démontrer que les PNA étudiés ont la capacité à former des liaisons Wobble (T-G), c’est pourquoi, désormais, les simulations du DINAMelt Web Server ne seront réalisées

qu'en choisissant le mode ARN.

Le DINAMelt Web Server permet par ailleurs la prédiction de la température de fusion de dimères. Nous émettons l'hypothèse que les températures de fusion théorique de l'ARN sont proches de celles des PNA similaires. Les températures de fusion des homodimères des divers PNA sont prédites ci après.

Le Web Server permet de déterminer la matrice présentée Table III.10. Pour une meilleure visibilité les chaînes d'oligonucléotides sont représentées, sans distinction PNA simple ou γ -PNA, avec la notation suivante :

A : GCCGTGGGTG correspondant à un brin de 8

A' : CACCCACGGC correspondant à un brin de 9

B' : TGCCGGTTCC correspondant à 7, et 5

B : GGAACCGGCA correspondant à deux brins de 8 et deux brins de 9, et au PNA 6

C : GCCGGT correspondant aux PNA 3 et 4

11 : AB_2

12 : $A'B_2$

13 : $AA'B_4$

Les PNA 1 et 2 ne sont pas présents dans cette table. Ils présentent une longueur de chaîne trop faible pour la formation d'homodimères en solution. Les PNA 10, 11, 12 et 13 sont des complexes (duplex ou triplex) formés à partir des PNA 5 et 6, 7 8 et 9. Ces derniers sont synthétisés afin de former des complexes parfaits très stables, sans mésappariements. Leur température de fusion sera plus élevée que ceux des complexes transverses (homodimères par exemple), et ne peuvent être calculés par ce biais. La chaîne d'oligonucléotides *C* sera mise en solution seule, il n'est alors pas nécessaire de calculer les appariements avec d'autres brins.

	A	A'	B	B'	C
A	57,4	70,4	44,4	53,4	
A'		34,7	28,8	47,3	
B			25,4	69	
B'				50,8	
C					35,8

FIGURE III.10 – Matrice des températures de fusion des appariements des divers PNA.

Sur cette matrice apparaissent en bleu les appariements complémentaires : A avec le brin A' et B avec le brin B'. Les températures prédites pour ces appariements complets (tous les acides nucléiques sont appariés) sont les plus élevées de la matrice. Ce qui est tout à fait normal, puisque dans ces cas, il s'agit uniquement de liaison Watson-Crick. Dans le cas des appariements partiels de PNA avec formation de liaisons Wobble (A-A ou autre) les températures de fusion sont plus faibles. L'information obtenue à l'aide du Web Server, référencée dans cette matrice sera très utile pour la préparation des échantillons. Ces températures de fusion indiquent au delà de quelle température les brins sont sous forme libre, sans appariement de quel type qu'il soit.

Pour l'étude des PNA, nous souhaitons favoriser les appariements les plus stables possible : les complexes complémentaires. La formation des complexes complémentaires étant prioritaire sur celle des homoduplexes, la préparation des échantillons doit être réalisée avec soin. Au vue des températures de fusion prédites, les échantillons subiront des cycles de chauffage (supérieurs au T_m le plus élevé de la matrice) afin de s'assurer que la fusion est bien dépassée. Ces "recuits" à température élevée éviteront au maximum la formation d'homoduplexes au profit des complexes complémentaires. Le refroidissement est lui aussi contrôlé, et se fait de manière lente.

III.3 Analyse des PNA par RMN

Les premières études par RMN de PNA furent réalisées sur des complexes PNA-ARN en 1994, [Brown 1994]. Les PNA ont été plus largement étudiés sous forme de complexes avec l'ARN ou l'ADN, et ce n'est qu'en 2008 que [He 2008] rapporte les premières informations structurales de duplexes PNA/PNA par RMN. Cependant, l'attribution complète de PNA par RMN n'est pas répertoriée en raison des difficultés d'attribution des protons méthylène du squelette du PNA.

Les analyses par RMN des PNA sont réalisées sur un spectromètre Bruker Avance III 700 MHz équipé d'une cryosonde avec gradients.

III.3.1 Expériences RMN à une dimension

Les PNA, présents sous forme solide, sont dissous dans de l'eau déminéralisée à laquelle est ajouté 10% de DMSO- d_6 et 10% de D₂O. Dès leur mise en solution, les PNA présentent un pH acide (entre 3 et 4). Les PNA sont analysés par RMN à pH acide, puis sont neutralisés par du tampon phosphate afin d'obtenir un pH proche de 6,8. Les PNA sont majoritairement analysés à pH neutre afin d'observer l'apparition des protons échangeables correspondants aux appariements de type Watson-Crick ou Wobble.

Dans un premier temps, les spectres 1D ¹H des PNA sont enregistrés.

III.3.1.1 Séquences de suppression d'eau

Les PNA sont solubilisés dans de l'eau non deutérée afin de conserver le signal de protons échangeables. Nous utilisons en conséquence diverses séquences d'élimination du signal de l'eau. La plus courante, la présaturation **zgpr** consiste en une impulsion longue et de faible puissance sur le signal d'eau. Un exemple de spectre 1D **zgpr** du PNA 2 est donné en figure III.11, il montre la complexité du spectre 1D pour un PNA de faible longueur de chaîne. Il apparaît plusieurs composés en proportions variables sur ce spectre. Plusieurs signaux protons relatifs aux bases nucléiques sont présents entre 5 ppm et 6 ppm. Nous verrons leur attribution un peu plus loin.

Sont aussi utilisées ici les séquences **excitation sculpting** (**es**) et **watergate** (**wg**) regroupant une série d'impulsions sélectives suivies d'applications de gradients. La dernière méthode de présaturation du signal résiduel de l'eau utilisée ici, est

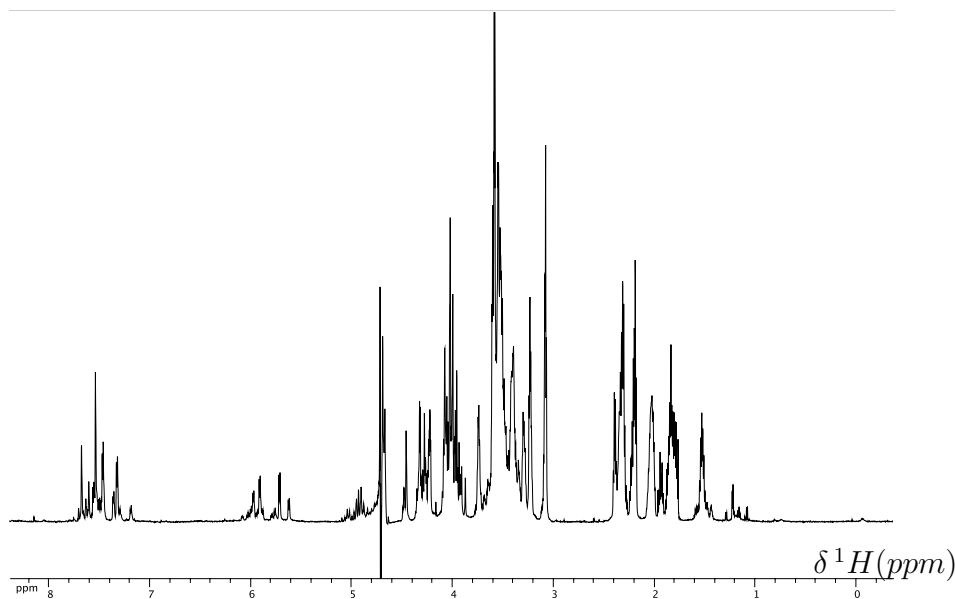


FIGURE III.11 – Spectre 1D ^1H zgpr du PNA 2 réalisé à 700 MHz, $[\underline{2}] = 2,12$ mM, $[\text{Phosphate}] = 25$ mM, $T = 298$ K.

la séquence **Jump & Return** (jr). Cette séquence a la spécificité de présaturer le signal d'eau tout en ne supprimant pas le signal des protons échangeables. Cette séquence est détaillée ci-après.

III.3.1.2 Séquence de suppression d'eau Jump & Return

La séquence d'impulsion **Jump & Return**, mise au point par [Plateau 1982], est représentée figure III.12.

La première impulsion 90° permet un alignement de tous les spins le long de l'axe x du référentiel tournant. La fréquence porteuse est placée à la fréquence des spins du solvant. Ils restent le long de l'axe x tandis que les autres spins précessent dans le plan xy durant le délai Δ . La seconde impulsion 90° ramène les spins du plan xy vers le plan zy . Les spins restés sur x sont basculés dans le plan z . Le signal est enregistré, et nous obtenons un signal sur $-y$ d'un côté du pic de l'eau et sur l'axe $+y$ de l'autre côté. Ainsi le spectre présentera un côté positif et un côté négatif. Le profil d'excitation est présenté en figure III.12, à droite en comparaison avec celui de la séquence de *Watergate*. Comme nous pouvons le voir, le signal de l'eau ne subit pas le même sort selon la séquence employée. Lors de la séquence **Jump & Return**, le signal de l'eau est modulé et passe à 0, tandis que pour la séquence *Watergate* le signal d'eau subit un filtrage.

L'avantage de cette méthode est que le signal d'eau n'est pas saturé (l'aimantation reste à son maximum) il reste à l'équilibre. En conséquence les signaux des spins en échange rapide restent visibles, ce qui est le cas des protons imino. Ces protons sont intéressants à observer dans cette étude puisqu'ils vont nous indiquer la présence d'appariements Watson-Crick, ou Wobble (selon leur déplacement chimique). Comme deviné d'après le profil d'excitation, cette expérience est non quantitative,

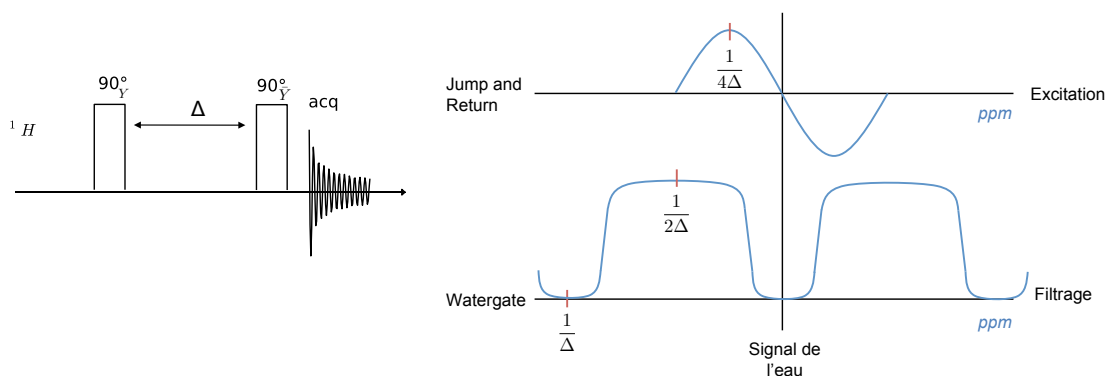


FIGURE III.12 – Gauche : Séquence d'impulsion **Jump & Return**. Les deux impulsions 90° sont en anti-phase et séparées d'un délai Δ . Droite : Profil d'excitation de la séquence **Jump & Return**, en haut, par comparaison à celui de la séquence de suppression d'eau **Watergate**, en bas.

les intensités du spectre ne sont pas respectées. Le maximum d'intensité du spectre est positionné à $\frac{1}{4\Delta}$, le signal redevient nul à $\frac{1}{2\Delta}$. Le délai Δ de la séquence peut être modifié en fonction de la région spectrale que l'on souhaite observer. Par exemple, afin de mieux percevoir les protons dans la fenêtre 11-14 ppm le délai Δ est calculé. Sur le spectromètre 700 MHz, la zone 11-13 ppm se situe à 4000 Hz du pic d'eau. Un spin fait alors 4 tours dans le référentiel tournant en 1 milliseconde, soit 1 tour en $250 \mu\text{sec}$. Il se retrouve alors sur l'axe z à $\Delta = \frac{250}{4}$, soit $62,5 \mu\text{sec}$.

Pour l'observation des protons présents à 11-14 ppm Δ sera choisi à $62 \mu\text{sec}$, et à $70 \mu\text{sec}$ pour un signal maximum des protons amino ou aromatiques (6-8 ppm).

Aucune interprétation de l'intensité des pics ne doit être faite sur ces expériences de **Jump & Return**.

Prenons comme exemple la molécule **3**, dont le spectre 1D ^1H est présenté figure III.13. Le signal de l'eau n'est pas saturé, il est modulé sous une forme de sinusoïde avec le 0 centré sur son signal. D'où la partie positive à gauche du pic d'eau (4,7 ppm) et la partie négative à droite. Sur ce PNA possédant 6 bases nucléiques, nous observons la présence de signaux compris entre 12 et 13 ppm. Ces signaux représentent les protons imino des appariements Watson-Crick et Wobble présents en solution. Les signaux RMN des protons imino relatifs aux appariements Watson-Crick entre bases G et C sont présents à des déplacements chimiques proches de 13,2 ppm, alors qu'ils sont proches de 14,0 ppm pour les appariements A-T. Les signaux proches de 12,0 ppm correspondent aux appariements Wobble entre bases nucléiques T et G. Nous observons alors deux types d'appariements présents ici pour le PNA **3**. Ce PNA présentant l'enchaînement **GCCGGT**, montre des appariements G-C et T-G ce qui correspond à la simulation d'homodimères par le DINAMelt WebServer présenté en bas à gauche du spectre 1D ^1H , figure III.13.

Les spectres 1D **zgj**r d'autres PNA sont présentés en annexe G.1.

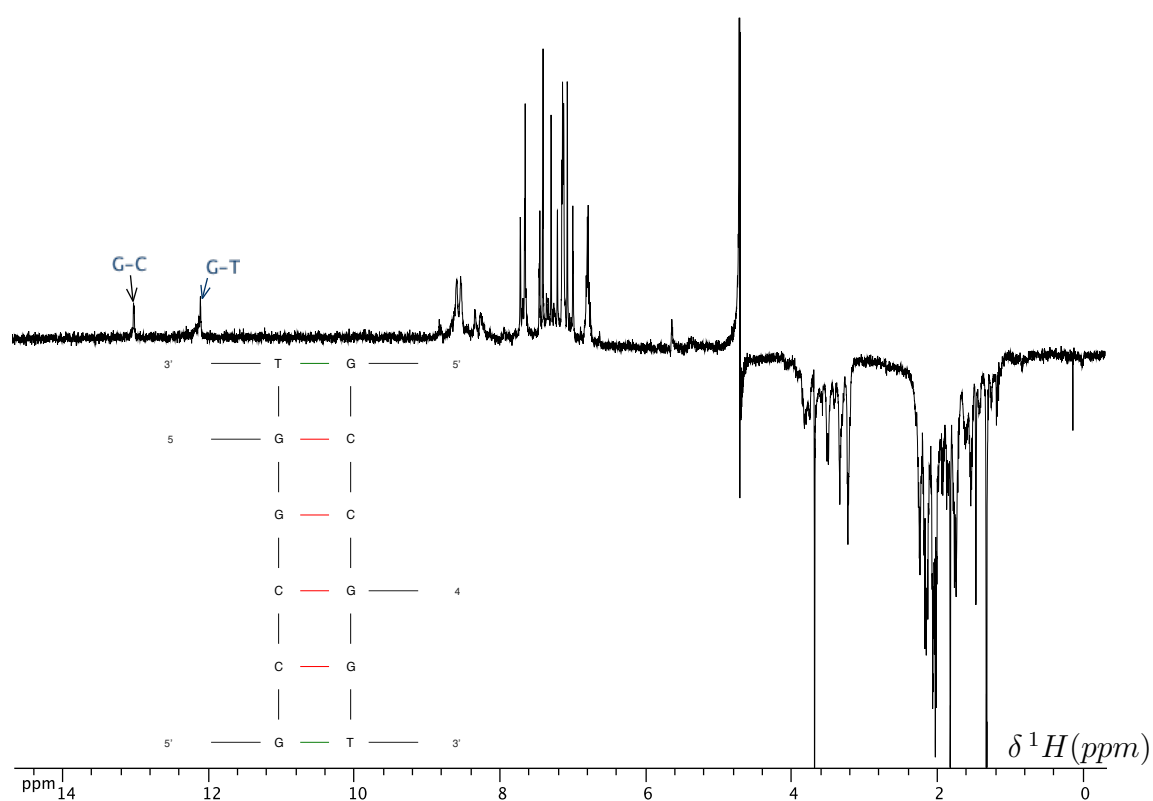


FIGURE III.13 – Spectre 1D proton Jump & Return du PNA 3 réalisé à 700 MHz, $[3] = 80\mu M$, $pH = 6$, $T = 298 K$, $NS = 128$.

III.3.2 Expériences RMN à deux dimensions

Afin d'étudier de manière complète les PNA par RMN en solution, diverses cartes 2D sont enregistrées. Les NOESY/ROESY sont utiles pour l'attribution et l'orientation spatiale des PNA, tandis que la DOSY nous renseigne sur le coefficient de diffusion de la molécule et donc si le PNA se trouve sous forme libre ou dimérisée. D'autres expériences 2D sont enregistrées pour aider à l'étude, et à la compréhension des différents systèmes, telles les TOCSY et HSQC. Pour information, les projections horizontales et verticales des spectres 2D présentent parfois le spectre 1D proton du PNA étudié pour une meilleure lisibilité.

III.3.2.1 NOESY Jump & Return

La séquence de NOESY standard est modifiée avec ajout de la séquence *Jump & Return*. La NOESY permet d'observer les corrélations entre noyaux dans l'espace. Implémenter cette séquence par la *jr* permet de rendre visible les protons échangeables, en particulier les protons imino responsables des liaisons Watson-Crick et Wobble formées lors d'appariements. S'ils sont visibles ces appariements peuvent nous apporter de précieuses informations quant à la structure secondaire des éventuels dimères formés. En effet, en cas de présence de taches NOE entre deux protons imino, ceci nous indiquera une proximité spatiale des ces liaisons. Un exemple est donné avec la figure III.14, où est représenté la carte 2D NOESY_{jr} du PNA 12.

Sur ce spectre, nous observons la présence de nombreux signaux NOE dans la région 6-9 ppm. Ils sont caractéristiques des échanges entre protons amino et chaîne méthylène du PNA. Concernant les protons imino présents à 12 ppm et 13 ppm, il est observé plusieurs taches d'échange avec le signal résiduel de l'eau. Des signaux NOE sont aussi visibles entre les protons imino des bases nucléiques avec les protons amino du squelette du PNA. Cependant, aucun contact imino-imino n'est retrouvé ici. La région à partir de 10 ppm est vide de tout contact NOE. Les signaux présents peuvent par ailleurs être des signaux de diffusion de spin. En raison de la faible concentration d'échantillon, les expériences de NOESY ont un temps d'acquisition très long, pouvant aller jusqu'à presque une journée pour cette carte 2D par exemple.

III.3.2.2 DOSY avec double présaturation d'eau

Des mesures de diffusion sont ensuite réalisées sur les divers PNA. Ces mesures vont nous aider à déterminer la présence de dimères attendus, ou encore d'homodimères. Les DOSY nous renseignent aussi quant à la pureté de l'échantillon. Les mesures de diffusion sont enregistrées avec une séquence *bp-led* vue dans le premier chapitre à laquelle est ajoutée une double présaturation. Une présaturation standard du signal de l'eau ainsi qu'une séquence dite *excitation sculpting* sont ajoutées afin de réduire au maximum le signal résiduel du solvant. Gardons l'exemple du PNA 12. L'analyse par RMN DOSY puis par ILT nous fournit les spectres représentés figure III.15. La DOSY est représentée selon deux agrandissements pour plus de lisibilité.

Sur ce spectre de diffusion, nous notons la présence de divers composés. Notamment une espèce légère diffusant à $D = 960 \mu\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$, et une espèce plus lourde

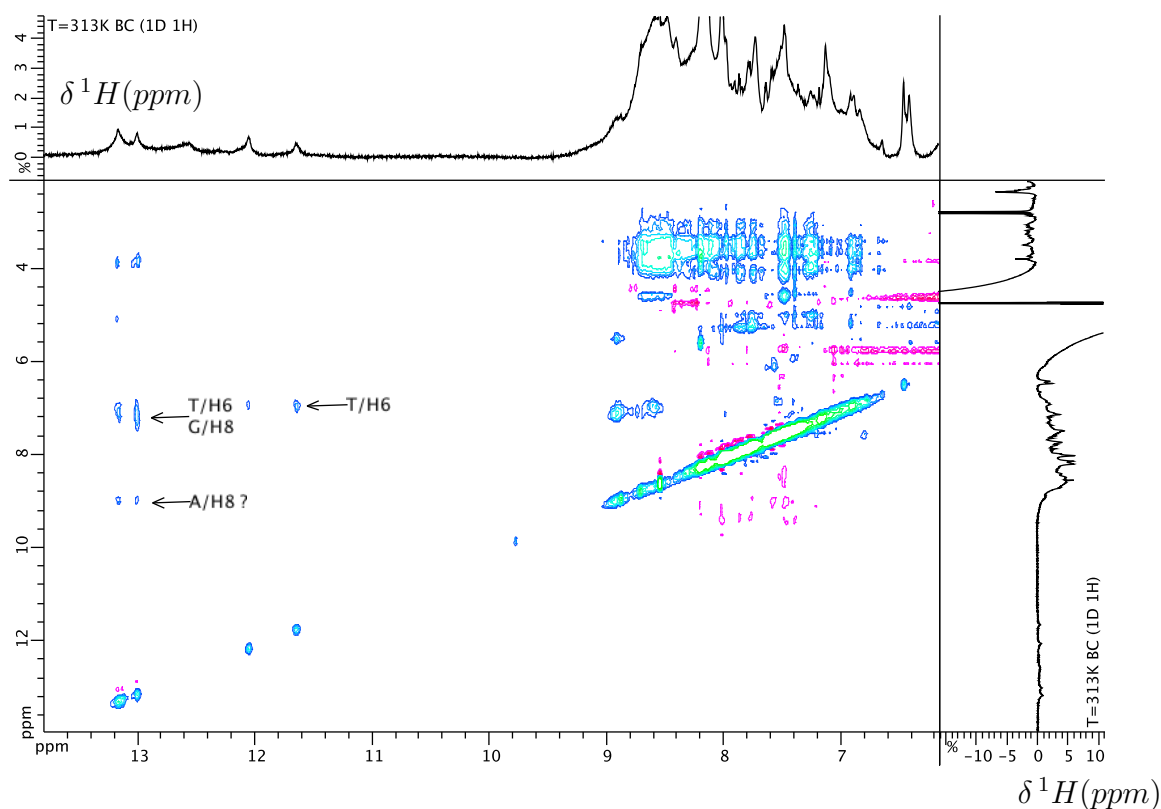


FIGURE III.14 – Spectre 2D NOESY Jump & Return du PNA 12 en tube de 3 mm réalisé à 700 MHz, $[12]=200\ \mu M$, $pH=6,8$, $T=313\ K$, Temps de mélange=400 msec, NS=320, temps d'expérience total : 22 h38 min. Zoom de la région 6 - 13 ppm. La séquence Jump & Return rend le phasage du spectre 2D difficile, d'où les petites erreurs de phase visibles.

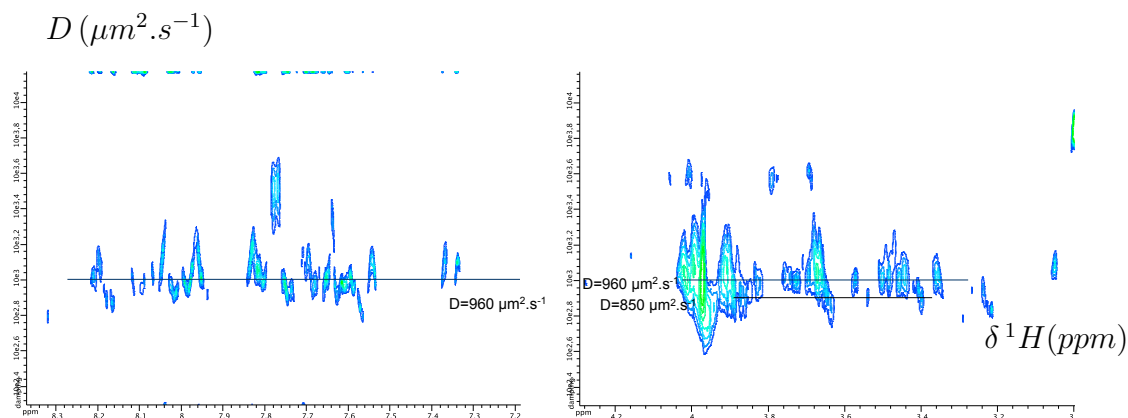


FIGURE III.15 – Spectres 2D DOSY du PNA 12 réalisé à 700 MHz, à 313K en tube de 3mm, $[12] = 200\ \mu M$, NS=128, temps d'expérience total : 3 h03 min.

à $D = 850 \mu\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$. Au vu de la masse molaire moléculaire du PNA 12 et de ces deux précurseurs, nous retrouvons sur cette DOSY les composés 7 et 9 seuls. Aucun composé lourd diffusant lentement n'est répertorié ici. Le dimère attendu n'est pas visible. De très légers résidus sont aussi visibles, indiquant la présence de résidus d'acides nucléiques.

III.3.2.3 Autres expériences de RMN à deux dimensions

D'autres expériences de RMN à deux dimensions plus classiques sont utilisées dans cette étude, telles les ROESY, TOCSY, HSQC.

Lorsque l'expérience de NOESY n'est pas possible, nous utilisons la ROESY. En effet, la ROESY est utile lorsque l'effet Overhauser est nul. Le NOE entre deux protons peut être positif pour les molécules en mouvement rapide, ou négatif pour des molécules en mouvement lent (protéines). Ce changement de signe implique un passage à zéro, pour la valeur de $\omega_0 \tau_c = 1$ ("tumbling" de la molécule). Avec τ_c le temps de corrélation rotationnel, et ω_0 la fréquence RMN. Lorsque nous sommes à ce point, la NOESY n'est pas réalisable, il faut enregistrer une ROESY.

L'objectif de la séquence TOCSY est ici de nous aider à l'attribution du squelette des PNA. Cette expérience permet d'observer les couplages scalaires. En modifiant le temps de mélange de la séquence TOCSY, nous observons les corrélations selon leur distance. Avec un grand temps de mélange, le résultat est le même qu'une COSY relayée. Plusieurs TOCSY peuvent être réalisées sur le même échantillon en modifiant le temps de mélange selon les corrélations recherchées.

Pour obtenir les déplacements chimiques des carbones de nos PNA, nous utilisons une expérience 2D HSQC. Disposant de peu de produit, cette expérience sera plus sensible qu'une expérience ^{13}C classique.

III.3.3 Variation de température suivie par RMN

Afin d'en apprendre davantage sur les protons imino, des expériences de variation de température sont réalisées et suivies par RMN. Selon l'échantillon et la sonde RMN utilisée, les températures sont variables dans une gamme de température comprise entre 338K et 288K. Ainsi, les signaux protons au delà de 11 ppm seront particulièrement observés, et pour cela l'utilisation de la séquence **Jump & Return** est nécessaire. Prenons comme exemple toujours, le PNA 12. Les courbes de variation de température sont regroupées en figure III.16.

Sur ce spectre sont présents entre sept et neuf protons imino qui ne sont pas proprement résolus. Cependant, nous pouvons noter que le signal tend à s'affiner avec une température haute (couleur rose). Deux exemples plus intéressants sont exposés en figure III.17. Les courbes de gauche présentent le PNA 3 et celles de droite, son analogue le PNA 4. La différence entre ces PNA est la présence de pseudo-sérines sur 4. Ces deux PNA possèdent le même enchaînement de bases nucléiques. Il apparaît ici sur le spectre du PNA 4 que les signaux présents à 12 ppm et à 13 ppm sont stables à haute température. Concernant le PNA 3 il n'en est pas de même, puisque le signal à 11,9 ppm tend à disparaître à haute température, il devient faible dès 313K. Ces spectres indiquent une différence dans la stabilité des liaisons imino

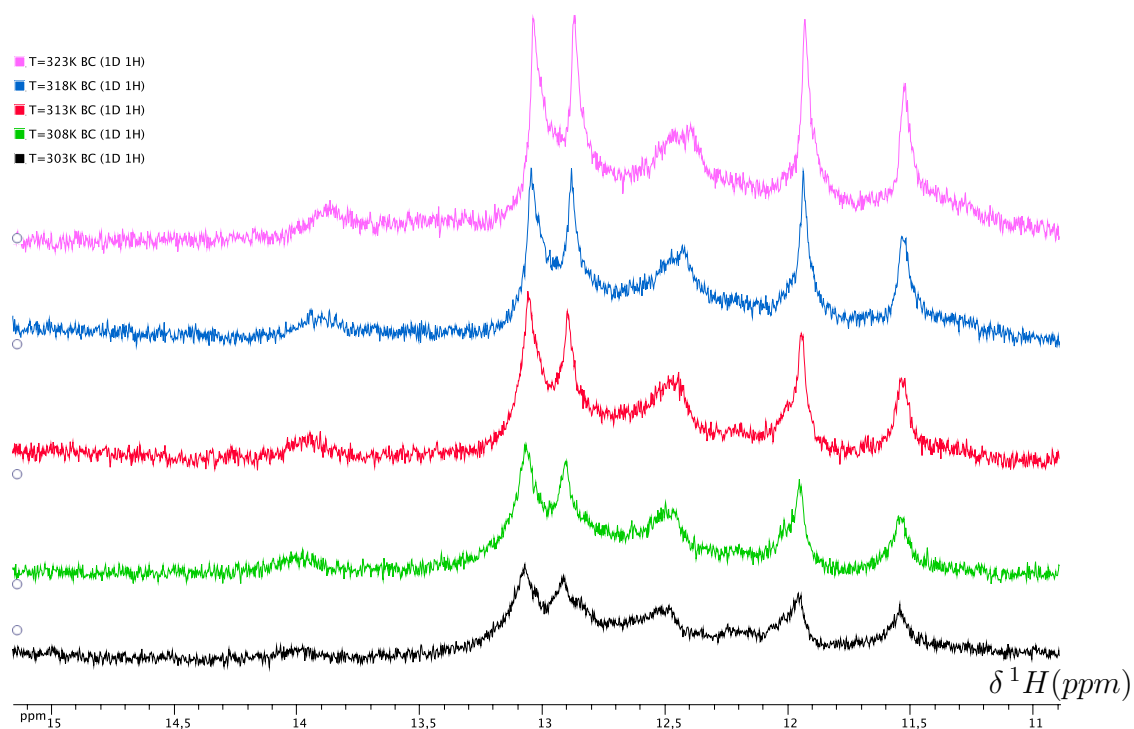


FIGURE III.16 – Spectres RMN 1D ^1H du PNA 12 réalisés à 700 MHz en variation de température. Les spectres sont présentés à température croissante en partant de la courbe noire ($T=303\text{K}$) jusqu'à la courbe rose ($T=323\text{K}$). $[\text{12}]=200\mu\text{M}$, $\text{pH}=6,8$.

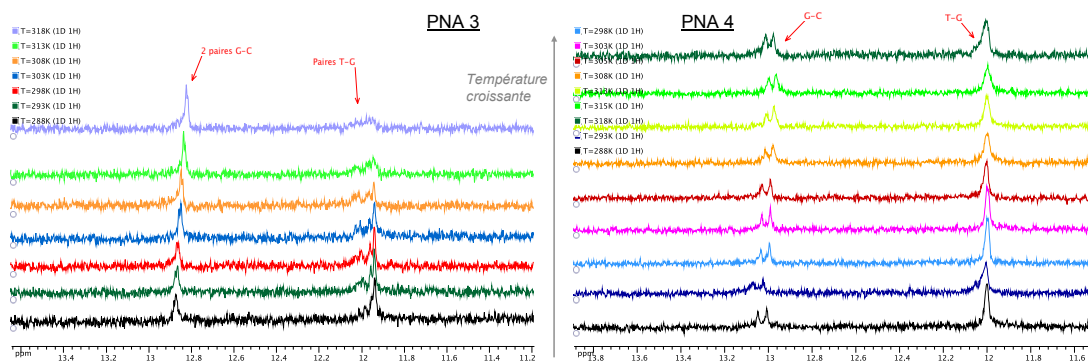


FIGURE III.17 – Spectres RMN 1D ^1H du PNA 3, spectre de gauche, et du PNA 4, spectre de droite. Spectres réalisés à 700 MHz en variation de température de 288K à 318K. Les spectres sont présentés à température croissante.

de ces deux PNA. Ainsi le PNA 3 possède des liaisons entre bases nucléiques T-G moins stables que son analogue le γ -PNA 4.

A l'aide de ces expériences de variation de température, nous savons que l'ajout d'une pseudo-sérine influence le comportement des PNA en solution. Les homodimères formés sont plus stables sur un PNA présentant un squelette de γ -PNA avec plusieurs centres chiraux. Les paires Wobble sont plus résistantes à la température sur les γ -PNA. Nous expliquons cela par une modification de la flexibilité engendrée par ces pseudo-sérines. En effet, les γ -PNA présentent une conformation plus rigide et moins aléatoire (hélices droites ou gauches forcées). Le repliement limite l'espace conformationnel accessible. En "déstabilisant" le monomère, pour le rendre moins flexible, la forme repliée est favorisée. Le complexe est stabilisé par déstabilisation du composé seul. Par conséquent les homoduplexes de γ -PNA sont plus stables que ceux des PNA standards dont les conformations sont plus aléatoires.

III.3.4 Interprétation des spectres RMN des PNA

Dans le but de simplifier la lecture des attributions, la numérotation officielle des acides nucléiques est employée, voir figure III.18.

Pour rappel, un spectre RMN 1D proton d'un PNA représente les signaux protons représentés figure III.19.

PNA 1 : Ce PNA est étudié en milieu acide, puis en milieu neutre à pH=6,8. Le spectre 1D ^1H enregistré en milieu acide ne présente pas de différence avec celui réalisé en milieu neutre (hormis les protons échangeables sensibles au pH). Le spectre en milieu neutre est présenté ci après en figure III.20 avec présaturation du signal d'eau. Sur ce spectre nous notons la présence de divers composés en proportions variables.

La carte 2D HSQC du PNA 1 est présenté en figure III.21. Les deux spectres HSQC ^1H - ^{13}C sont deux agrandissements du spectre HSQC complet. Les taches de

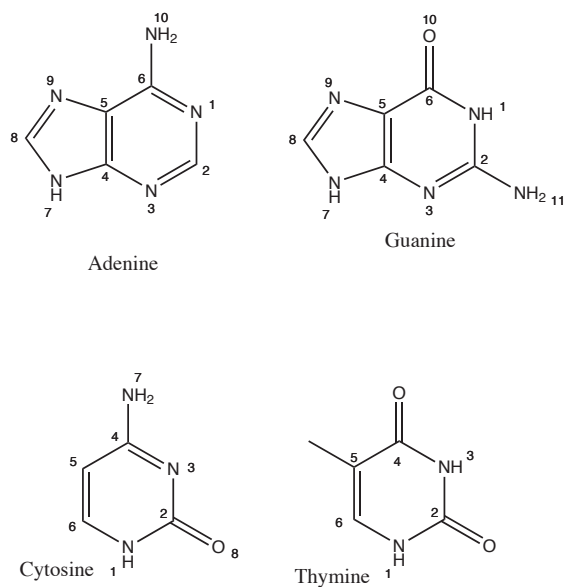


FIGURE III.18 – Numérotation officielle des acides nucléiques

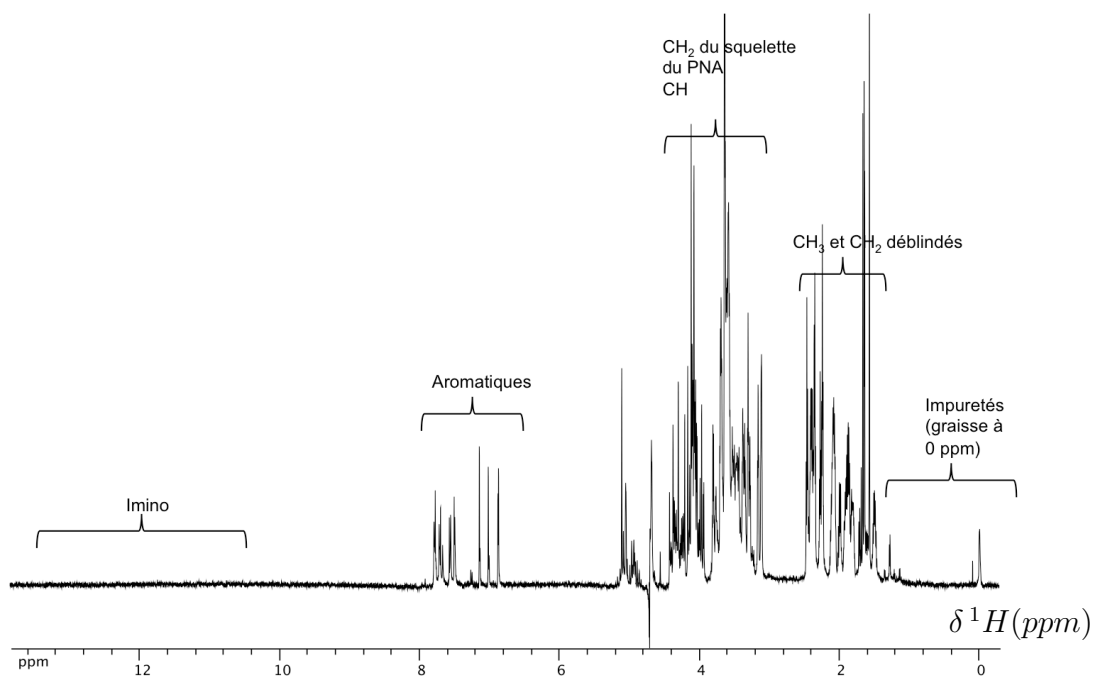


FIGURE III.19 – Spectre 1D proton d'un PNA réalisé avec présaturation du signal d'eau à 700MHz

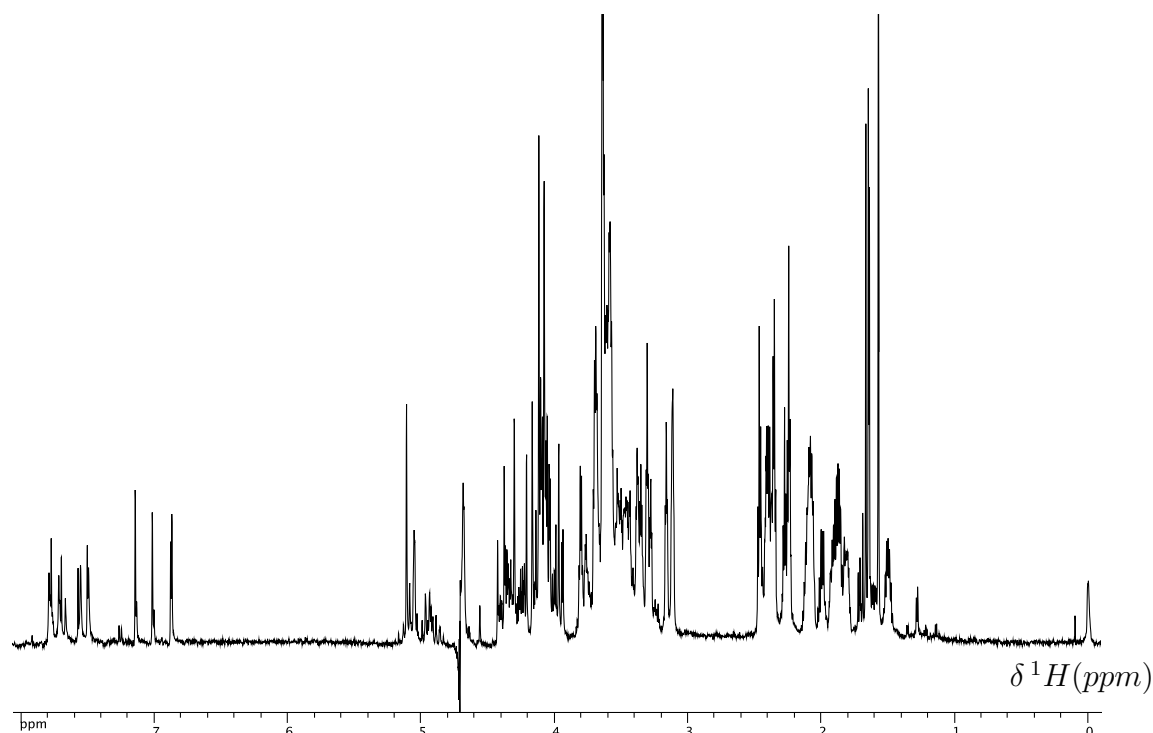


FIGURE III.20 – Spectre 1D ^1H , *zg avec présaturation* du PNA 1 réalisé à 700 MHz. $[\text{1}]=1,56\text{ mM}$, $[\text{Phosphate}]=25\text{ mM}$, $T=298\text{ K}$.

corrélations présentes à 1,5 ppm en fréquence proton et 10 ppm en fréquence carbone (rectangle bleu, spectre de droite) indiquent la présence d'au moins trois groupes méthyle. A ces déplacements chimiques seul le méthyle d'une base nucléique *T* est attendu. Un seul méthyle est attendu ici en accord avec la présence d'une base *T* sur le PNA 1 (de formule **Glu-Glu-GGT**). Nous sommes probablement en présence de différentes formes du PNA 1. Sur le zoom de gauche présentant les régions des protons aromatiques, nous notons la présence de trois protons **H6** de la base *T* à 143 ppm, et de deux (voire quatre) protons **H8** de la base nucléique *G*.

Les expériences de **DOSY** réalisées ici n'ont pas apporté d'informations pertinentes utiles pour l'attribution du PNA 1. Un composé diffusant de façon similaire au PNA 1 attendu est observé. Le spectre de **DOSY** est présenté en annexe **G.2**.

Les études du PNA 1 nous indiquent un composé non pur, en mélange avec d'autres molécules en solution. La possibilité de plusieurs formes du PNA en échange lent est envisagée. Réaliser un spectre **ROESY** permet de discriminer ces formes, or l'expérience ne nous montre pas de signaux d'échanges. Nous ne statuons pas sur la présence du PNA 1 car bien trop de bases nucléiques sont présentes.

PNA 2 : Ce PNA est analysé en milieu acide, puis en milieu neutre à $\text{pH}=6,8$. Le spectre 1D ^1H enregistré en milieu acide ne présente pas de différence avec celui réalisé en milieu neutre, il n'est pas présenté. Les suivis du spectre RMN lors de la variation de température n'ont pas apporté d'informations supplémentaires et ne sont pas présentées.

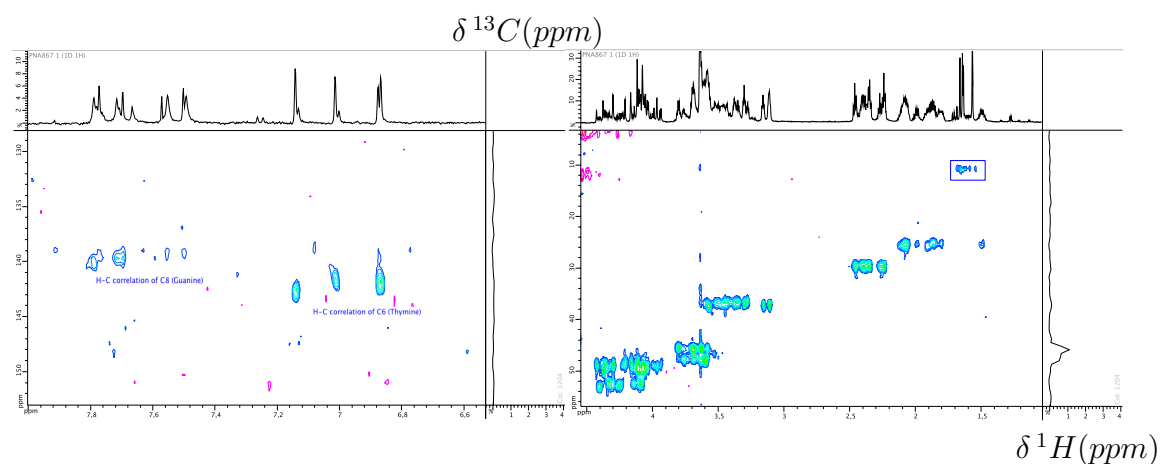


FIGURE III.21 – Spectre 2D 1H - ^{13}C , HSQC du PNA 1 réalisé à 700 MHz. $[1]=1,56$ mM, $[Phosphate]=25$ mM, $T=298K$.

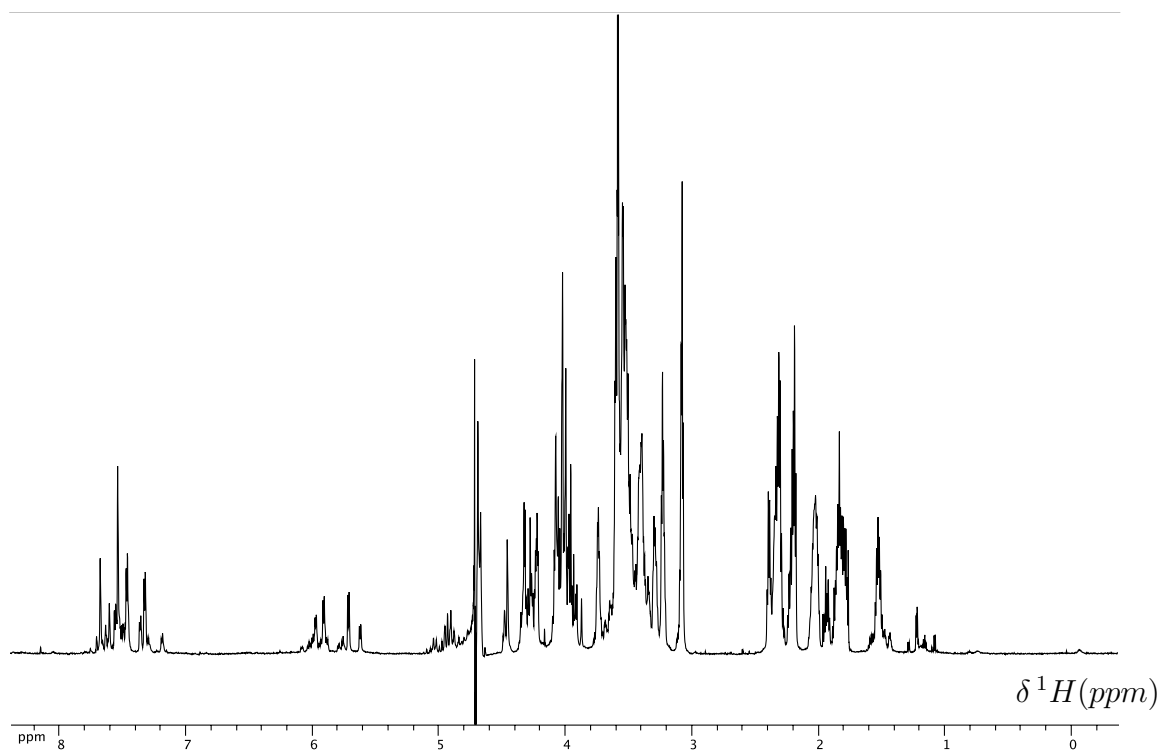


FIGURE III.22 – Spectre 1D 1H , zg avec presaturation du PNA 2 réalisé à 700 MHz. $NS=128$, $[2]=2,12$ mM, $[Phosphate]=25$ mM, $T=298K$.

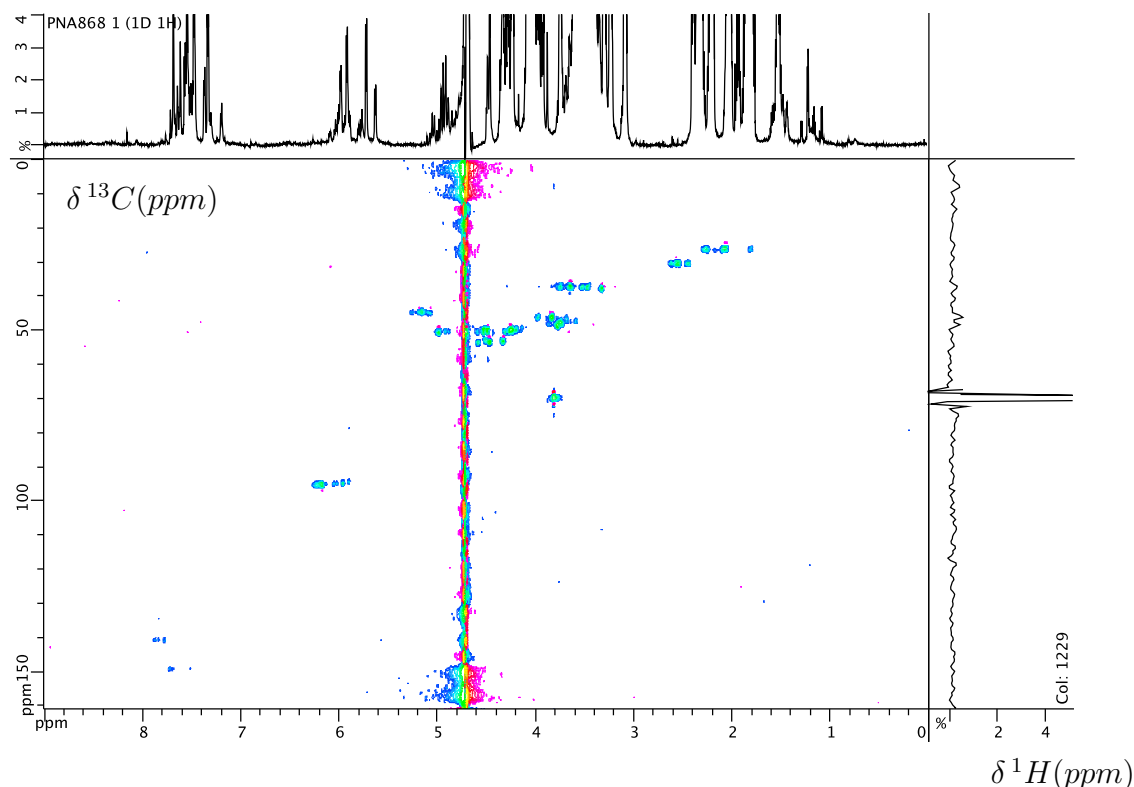


FIGURE III.23 – Spectre 2D ^1H - ^{13}C , HSQC du PNA 2 réalisé à 700 MHz. NS=256 [2]=2,12 mM, [Phosphate]=25 mM, T=298K.

Le spectre 1D ^1H du PNA 2 avec présaturation du signal d'eau est présenté figure III.22. La présence de divers composés en proportions variables est visible ici. Le spectre 1D Jump & Return du PNA 2 est présenté en annexe G.3. Sur ce spectre aucun protons imino ne sont visibles. Il n'y a donc aucun auto-appariement de ce PNA. La présence d'acides nucléiques est confirmée sur la carte 2D HSQC de la figure III.23.

Dans la région 5,8 ppm-6,3 ppm/95 ppm, voir agrandissement présenté en figure III.24, nous confirmons la présence de protons **H5** des bases nucléiques *C* du PNA 2 (pour rappel, 2 : Glu-Glu-GCC). Les taches de corrélations à 7,6-7,9 ppm/140 ppm indiquent la présence des protons **H8** des bases *G*, voir agrandissement présenté en figure III.24. Les taches de corrélation **H6** des bases *C* résonnent à 7,5-7,5 ppm/149 ppm. Malheureusement, nous dénombrons plus de bases nucléiques que de bases attendues, seules deux bases *C* et une base *G* sont attendues et nous en retrouvons davantage sur cette HSQC.

La présence de plusieurs composés est confirmée par l'expérience de DOSY dont le spectre est présenté en figure III.25.

Ce PNA présente lui aussi une variété de molécules en solution. La possibilité des diverses formes du PNA 2 en échange lent n'est pas confirmée par l'expérience de ROESY. Les spectres 2D ROESY sont présentés en annexe G.4 et G.5. Une attribution complète n'est pas réalisable ici en raison du nombre de composés et des recouvrements de raies. Les divers composés ne sont pas distingués sur les cartes

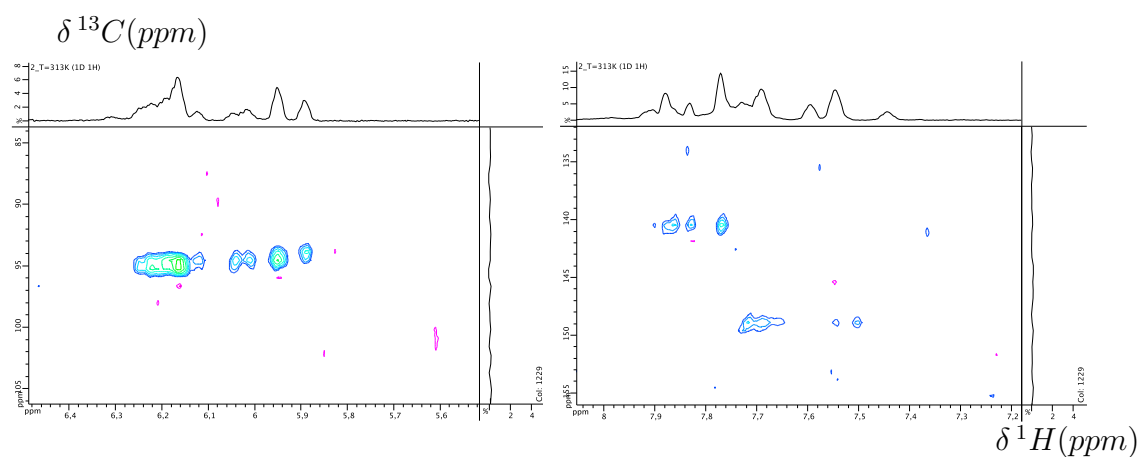


FIGURE III.24 – Agrandissements du spectre 2D ^1H - ^{13}C , HSQC du PNA 2 réalisé à 700 MHz. $[\underline{2}] = 2,12$ mM, [Phosphate]=25 mM, T=298K.

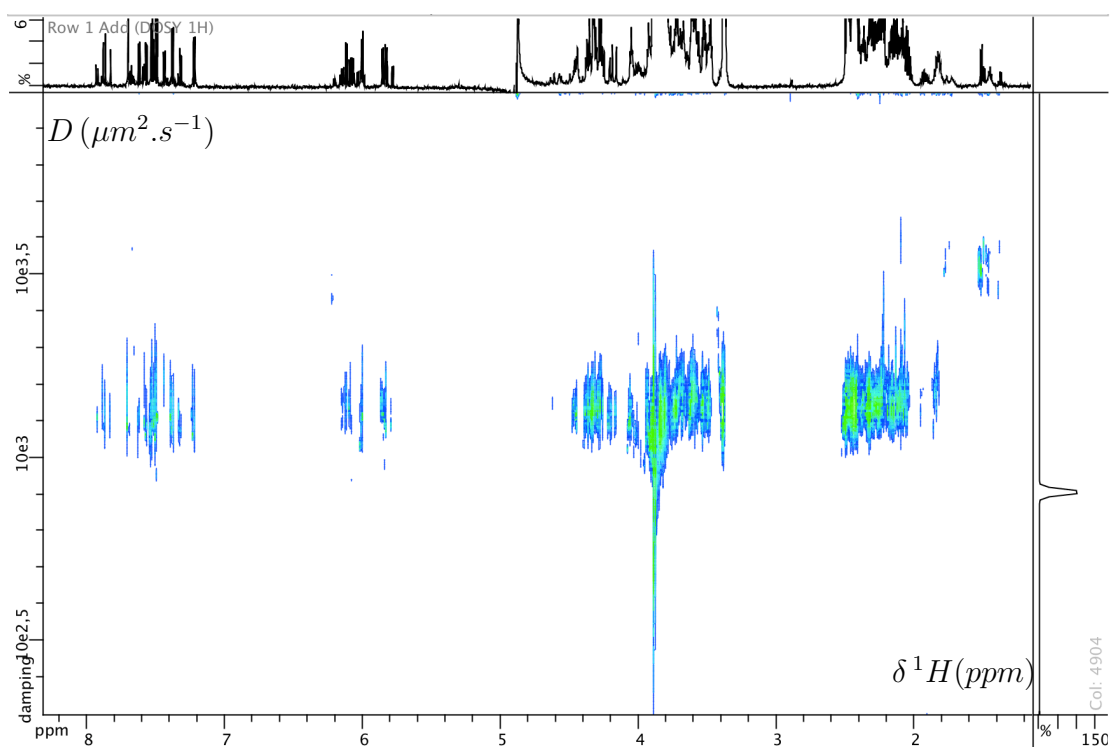


FIGURE III.25 – Spectre 2D DOSY du PNA 2 réalisé à 700 MHz. NS=48, $[\underline{2}] = 2,12$ mM, [Phosphate]=25 mM, T=298K, temps d'expérience : 75 min.

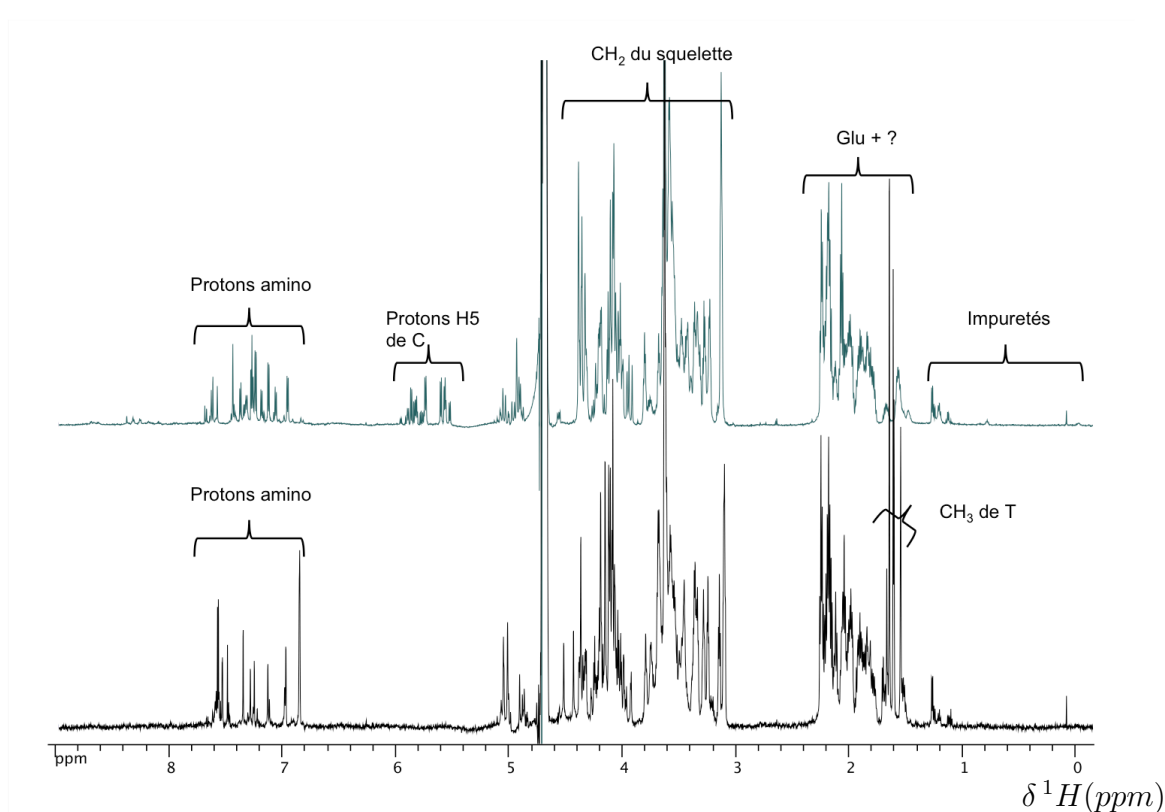


FIGURE III.26 – Spectres 1D ^1H , *zgpr* des PNA 1 (spectre du bas, noir) et 2 (spectre du haut, vert) réalisés à 700 MHz.

2D, par conséquent le PNA 2 n'est pas mis en avant dans les spectres, et est difficile à retrouver.

Les seules indications obtenues sur le PNA 2 sont regroupées sur le spectre vert en figure III.26. Sur ce spectre sont présentés les PNA 1 en noir et le PNA 2 en vert.

PNA 3 : Le spectre 1D ^1H Jump & Return du PNA 3 est présenté en figure III.27. Pour rappel, le PNA 3 est : Glu-Glu-GCCGGT. Par comparaison avec deux précédents PNA, les PNA 1 et 2, des signaux protons sont visibles au delà de 11 ppm. Ces signaux imino indiquent qu'un appariement a eu lieu entre deux bases nucléiques. Le suivi de ces signaux lors de la variation de température est représenté en figure III.17 dans la partie Variation de température suivie par RMN III.3.3. Ces spectres indiquent que le PNA 3 a tendance à s'apparier pour former des homodimères, phénomène qui n'était pas observé avec les PNA plus courts 1 et 2. Les signaux présents à 11,9 ppm sont des signes d'appariement imino entre une base *G* et une base *T*. Tandis que les deux signaux protons visibles à 12,9 ppm sont attribués aux protons imino de type *G-C*. Les protons imino *T-G* sont peu stables et disparaissent à haute température (318K) alors que les protons imino relatifs aux paires *G-C* sont plus stables et toujours visibles à haute température. Sur la figure III.13 est représenté le résultat d'homo-appariement obtenu à l'aide du DINAMelt WebServer. Nous dénombrons quatre paires *G-C* équivalentes deux par deux en RMN et deux paires

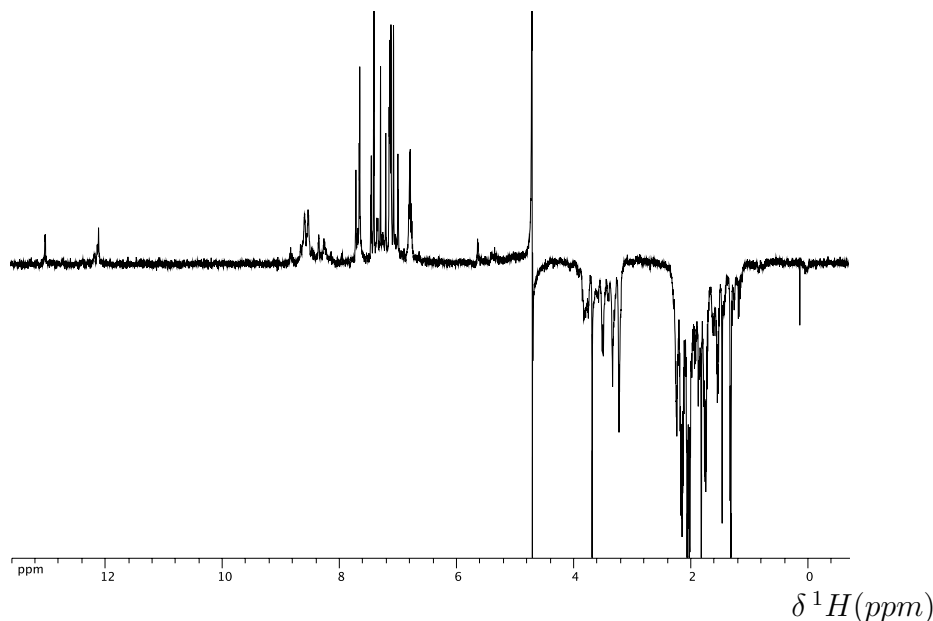


FIGURE III.27 – Spectre 1D ^1H zgjr du PNA 3 réalisé à 700 MHz. $[\text{3}] = 80 \mu\text{M}$, $[\text{Phosphate}] = 25 \text{ mM}$, $T = 298 \text{ K}$.

T-G équivalentes. Nous devrions en conséquence observer deux paires G-C et une paire T-G sur le spectre 1D proton en cas de formation d'homodimère. Deux paires T-G semblent présentes, mais les paires G-C sont plus difficilement distinguables. La température de fusion théorique (fournie par le DINAMelt par analogie avec l'ARN) de cet homodimère de PNA est de $35,8^\circ$ (308K). Au delà de cette température le PNA est libre en solution, et non apparié. C'est ce que nous commençons à observer sur les spectres protons enregistrés à différentes températures. La formation d'hairpin n'est pas possible ici, à cause de la faible longueur de chaîne du PNA.

L'expérience 2D NOESY, présenté figure III.28 nous retourne des informations uniquement sur une partie restreinte du spectre. Les protons d'intérêt, les protons imino, ne présentent une tache NOE qu'avec le pic d'eau. Aucune information concernant une structure secondaire ne peut être obtenue. Le temps d'acquisition est très long et le rapport signal sur bruit peu satisfaisant, de ce fait cette expérience est difficilement exploitable. L'expérience de RMN 2D HSQC ^1H - ^{13}C présente très peu de signaux RMN après plus de 1 jour et 19h de temps d'acquisition. Seuls les carbones aliphatiques sont présents et ne sont d'aucune utilité ici. Ce spectre se trouve en annexe G.6.

PNA 4 : Le PNA 4 est similaire au PNA 3, il est de forme Glu-Glu-GCCGGT avec l'intégration de pseudo sérines : Glu-Glu-G*CC*GG*T.

Le spectre 1D ^1H Jump & Return du PNA 4 est présenté en figure III.29. Sur ce spectre apparaissent des protons imino au delà de 11 ppm, preuve d'un appariement entre brins de PNA. Deux paires G-C à 13,09 ppm et une paire T-G à 12,07 ppm sont clairement distinguables. Les intégrales sont représentées à titre indicatif, comme expliqué précédemment, l'expérience Jump & Return n'est pas quantitative. C'est

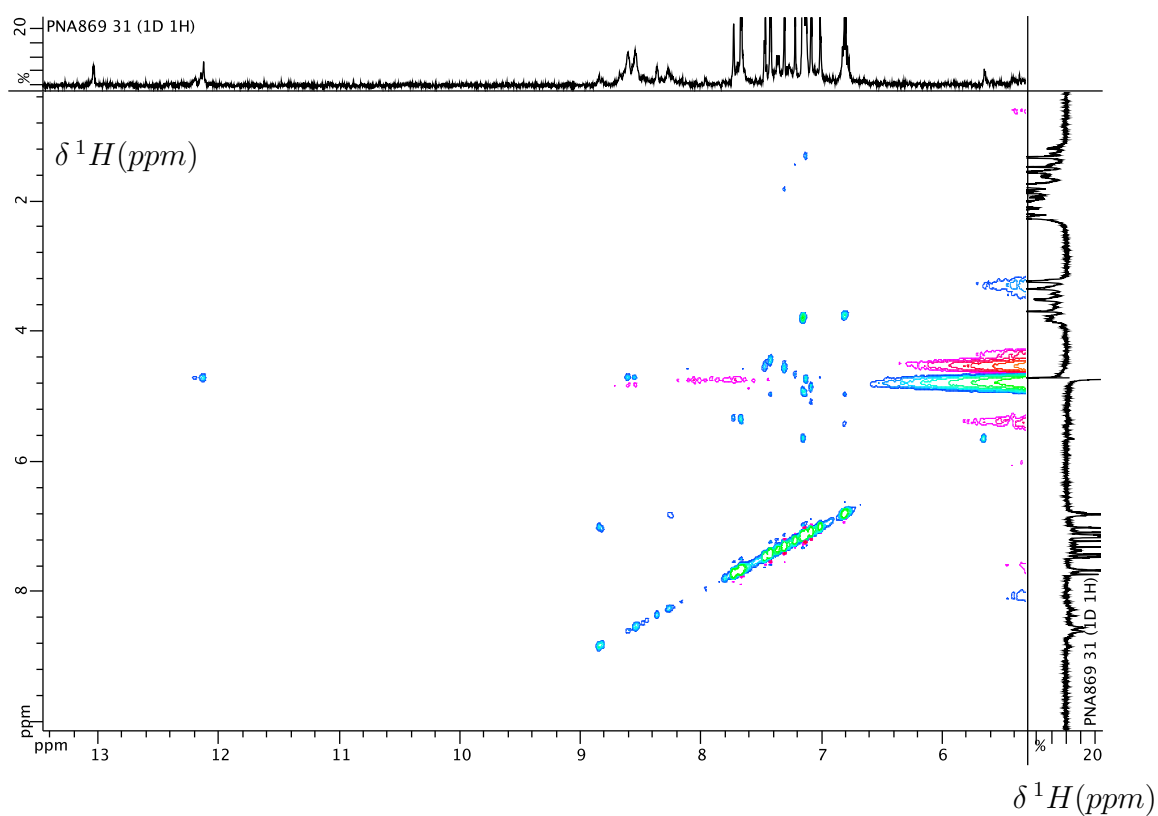


FIGURE III.28 – Spectre 2D ^1H - ^1H NOESY Jump & Return du PNA 3 enregistré à 700 MHz. $[\text{3}] = 80 \mu\text{M}$, $[\text{Phosphate}] = 25 \text{ mM}$, $T = 313\text{K}$, temps de mélange = 250 msec.

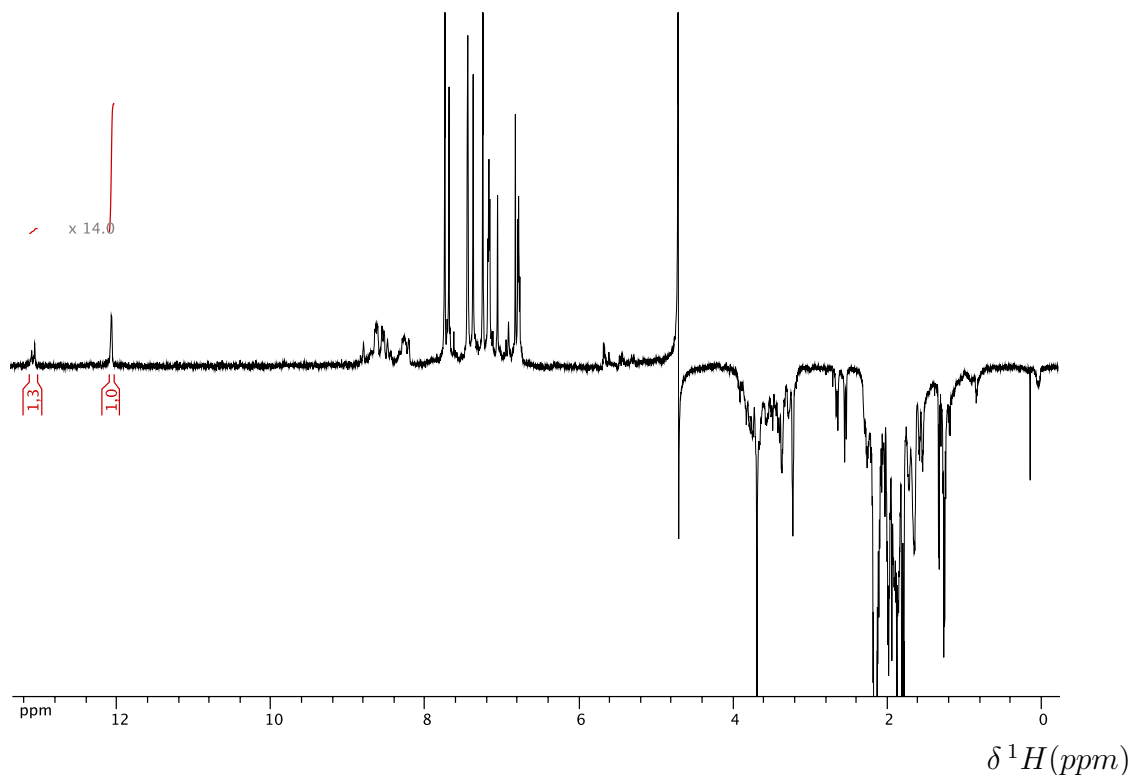


FIGURE III.29 – Spectre 1D ^1H zgjr du PNA 4 réalisé à 700 MHz. $[\text{4}] = 1,1 \text{ mM}$, $[\text{Phosphate}] = 25 \text{ mM}$, $T = 298 \text{ K}$, $\text{NS} = 196$.

assez flagrant sur ce spectre puisque deux protons imino résonnent à 13,09 ppm et un seul proton résonne à 12,07 ppm or les mesures d'intégrales indiquent un ratio 1,3/1. De plus les signaux amino vers 5 ppm sont très peu visibles. C'est une belle illustration de la figure III.12 sur l'intensité variable du spectre RMN lors de l'utilisation de la séquence **Jump & Return**. Pour observer les protons amino de manière plus précise, une expérience **zgpr** est enregistrée (spectre à pH acide). Le spectre est présenté en annexe G.7.

Les trois protons imino correspondent à ce qui est attendu lorsque le PNA 4 dimérise, voir la simulation du dimère de 4 en annexe H.4. Les paires de bases G-C sont magnétiquement équivalentes deux à deux, et les deux paires T-G sont elles aussi magnétiquement équivalentes. Sur le spectre RMN doit donc apparaître seulement deux paires G-C et une T-G, ce qui est le cas sur notre spectre 1D ^1H **Jump & Return**, figure III.29. La stabilité des signaux protons imino est suivie par variation de température. Le spectre est présenté en figure III.17, comme vue précédemment dans la partie sur la variation de température III.3.3. Par comparaison au PNA 3, la paire T-G présente ici est stable à haute température. Elle est toujours présente à 318K, tandis que pour le PNA 3 elles ne le sont presque plus. L'introduction de trois pseudo sérines en position γ sur le squelette du PNA augmente la stabilité des complexes formés en solution (hairpin ou homodimère). Les appariements sont plus forts et la dénaturation du PNA est plus longue. Pour des raisons de limitations instrumentales, le spectre RMN n'a pu être suivi à plus haute température.

Pour nous aider à attribuer le spectre 1D ^1H du PNA 4, nous réalisons des cartes 2D, telles la NOESYjr, la TOCSY et une HSQC. Le PNA 4 est présent en faible quantité, comme le laisse apparaître l'expérience d'HSQC après 24 heures d'acquisition, figure III.30.

Sur ces zoom de l'HSQC, nous retrouvons deux taches de corrélations correspondant aux protons **H8** et carbones **C8** de la base *G* à 7,44/140,9 ppm et 7,17/146,5 ppm. La tache de corrélation présente à 7,37/143,3 ppm est attribuée à **H6/C6** de la base *T*. La corrélation visible à 7,17/146,5 ppm est quant à elle attribuée à **H6/C6** de la base nucléique *C*. Sont aussi présentes deux taches à 5,44/96,2 ppm et 5,67/96,9 ppm attribuées à **H5** de *C*. Ici, nous remarquons qu'il manque des acides nucléiques. Pour rappel, 4 = Glu-Glu-GCCGGT.

Les trois bases *G* ne sont pas visibles, tout comme le deuxième **H6/C6** de *C* probablement perdu dans le bruit. Malgré une journée d'acquisition, le rapport signal sur bruit du spectre est peu satisfaisant. Le signal correspondant au **CH₃** de *T* résonne à 1,80/11,2 ppm, mais étant proche du signal du bruit il n'est pas montré afin que la carte 2D ne soit pas surchargée de bruit. Les expériences de NOESYjr et TOCSY ayant été utiles à l'attribution sont présentées en annexe G.8 et G.9. La NOESY fourni peu de signal pour un temps d'acquisition relativement long. Les protons imino ne donnent aucune corrélation si ce n'est avec l'eau. Avec l'expérience de TOCSY, il est difficile de déterminer avec précision les corrélations. Le signal est souvent perdu "dans la masse" de protons entre 3 et 4 ppm ou dans le massif présent à 2 ppm. Nous faisons face à un grand nombre de recouvrements de raies dues à la complexité de la molécule et autres structures présentes en solution.

Les informations relatives à l'attribution de ce PNA sont regroupées sur le spectre présenté en figure III.31.

PNA 5, 6 et 10 : Les PNA 5, 6 et 10 n'ont pas été analysés par RMN par faute de temps d'accès au spectromètre.

PNA 7 : Le spectre 1D Jump & Return du PNA 7 est présenté en annexe G.1. Pour rappel le PNA 7 est de forme Biotine-TGCCGGTTCC. Deux signaux de protons imino sont présents ici, nous suivons ces signaux par variation de température en figure III.32.

Ici aussi, le signal à 12,1 ppm, témoin d'un proton imino, indique un appariement T-G. Cet appariement est moins stable à haute température que le signal à 13 ppm d'un imino de paire G-C.

Une expérience de DOSY est enregistrée sur ce PNA, elle est présentée en figure III.33. Ce spectre indique la présence de peu d'impuretés et d'un produit majoritaire à $D = 1,03.10^3 \mu\text{m}^2.s^{-1}$. En utilisant le signal du DMSO comme référence, nous pouvons utiliser la règle de 3 pour calculer la masse molaire du PNA analysé. Comme vu dans le chapitre II, la masse molaire est proportionnelle au coefficient de diffusion apparent. Ainsi, le calcul de la masse molaire de cette molécule nous indique 3 kD. Le PNA attendu possède une masse moléculaire de 3,5 kD, nous sommes ici bien en présence du PNA 7. Il n'est pas impossible que ce PNA se trouve sous forme d'hairpin.

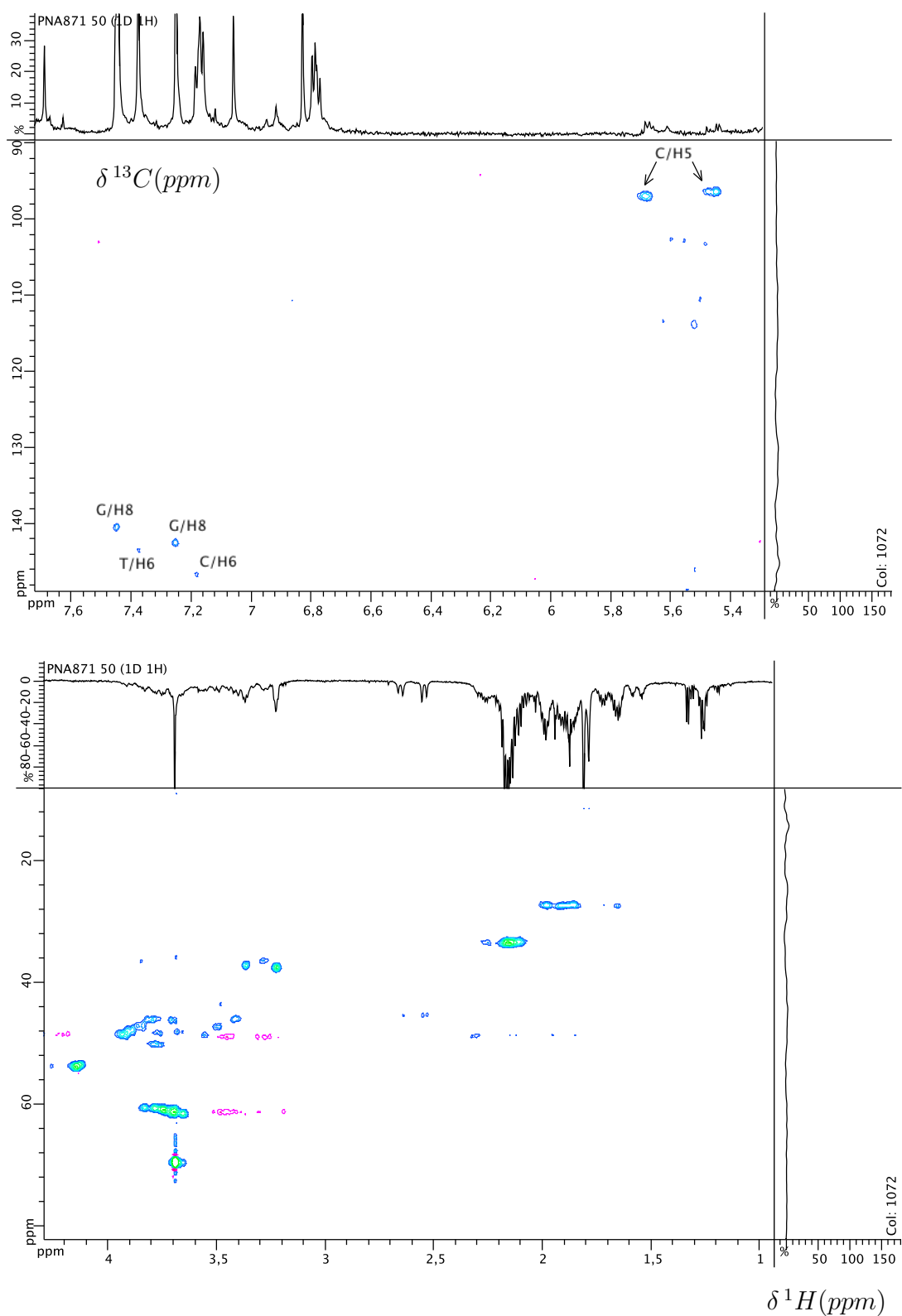


FIGURE III.30 – Spectres 2D ^1H - ^{13}C , HSQC du PNA 4 réalisé à 700 MHz. NS=256 [4]=1,1 mM, [Phosphate]=25 mM, T=303K, temps d'acquisition : 1 jour. Agrandissement des deux régions où les taches de corrélations sont visibles.

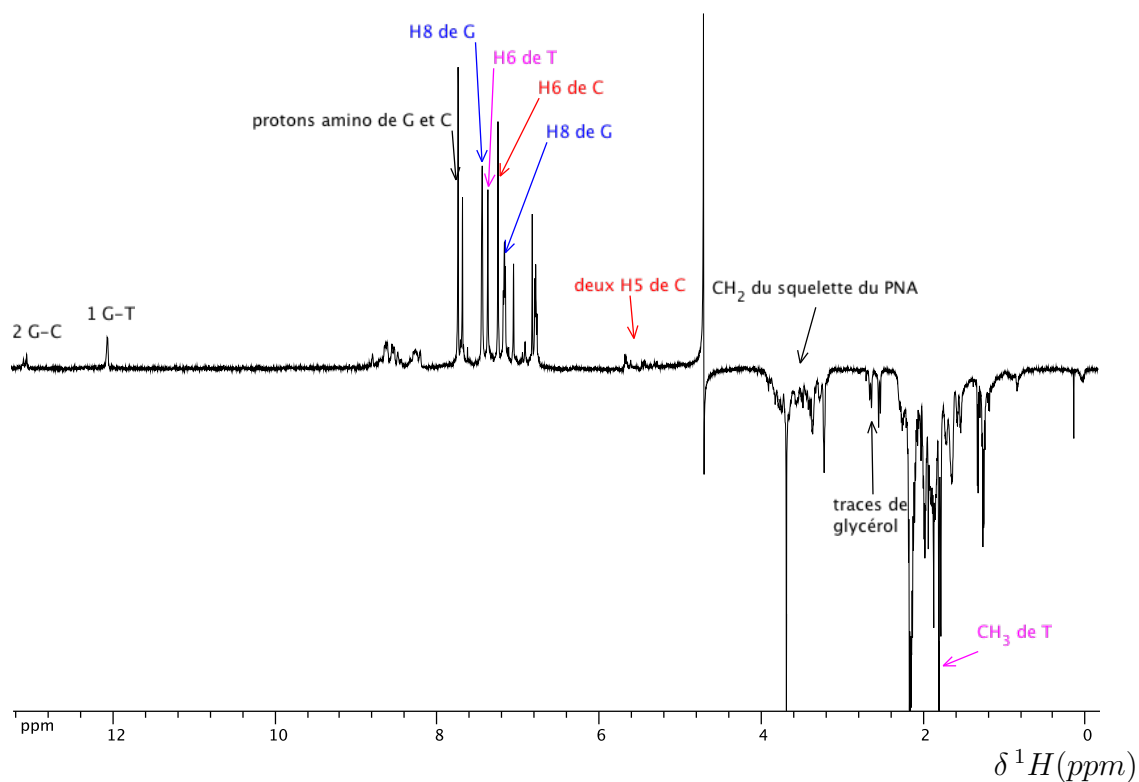


FIGURE III.31 – Attribution du spectre 1D ¹H, zgjr du PNA 4.

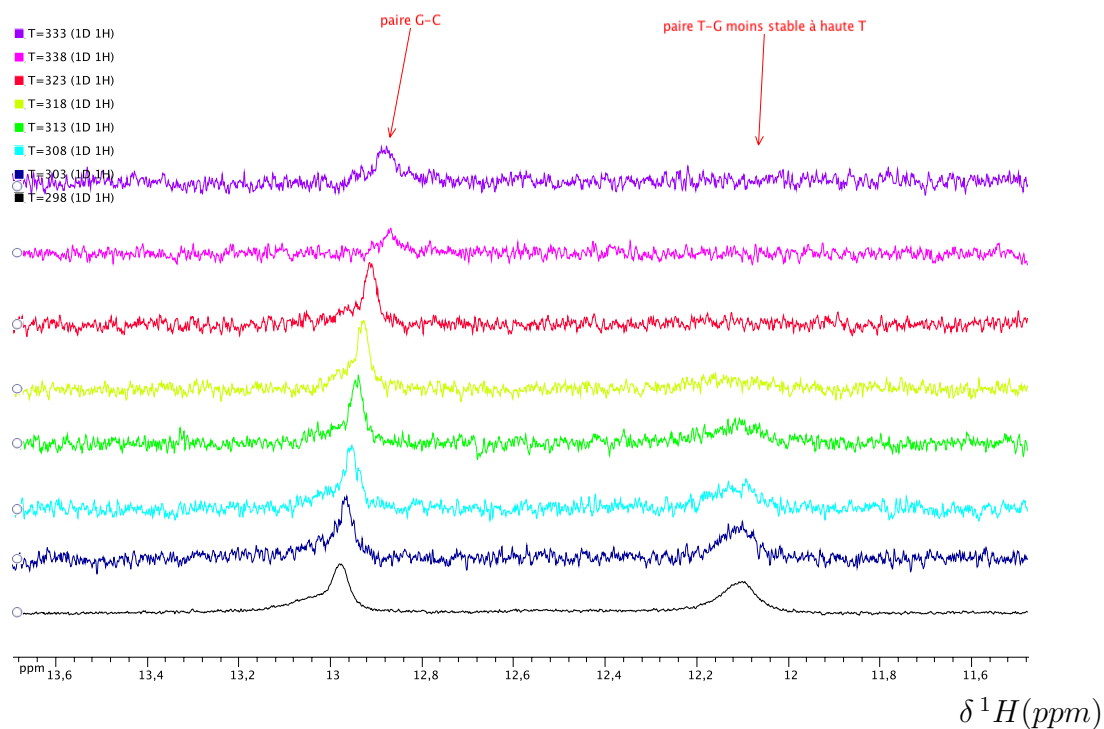


FIGURE III.32 – Spectres 1D ¹H, zgjr du PNA 7 en variation de température, 298 à 333K. Spectres enregistrés à 700 MHz, $[\underline{7}]=1,71$ mM, [Phosphate]=15 mM.

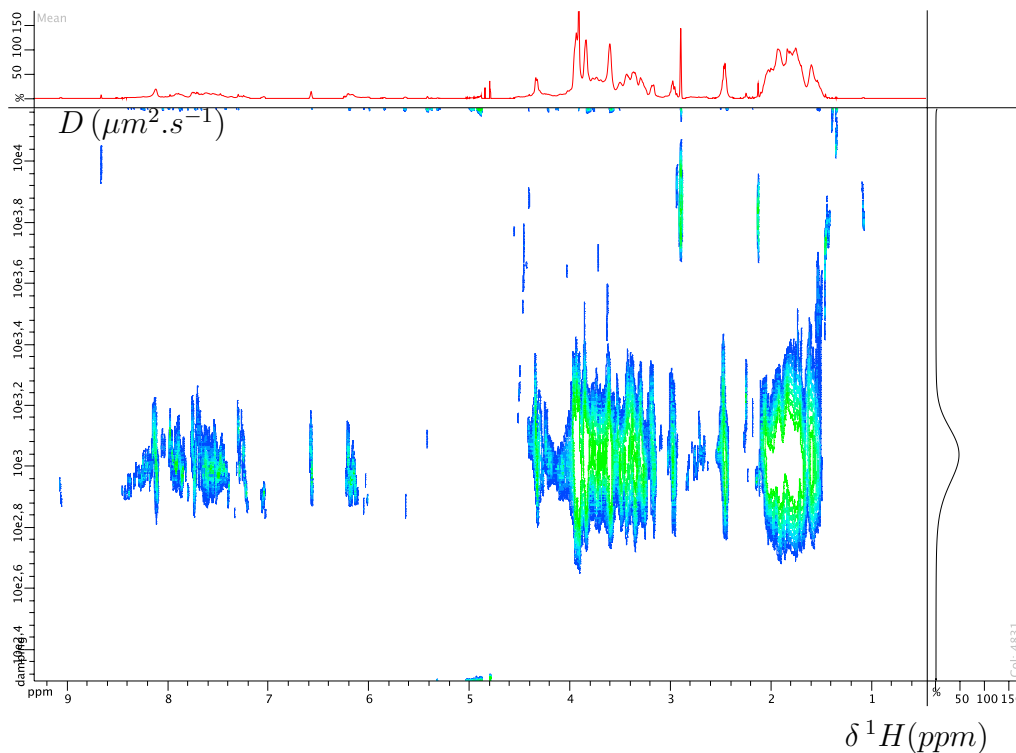


FIGURE III.33 – Spectre 2D DOSY du PNA 7 réalisé à 700 MHz, $[7]=1,71$ mM, [Phosphate]=15 mM, $T=313$ K, temps d'expérience : 3h.

L'expérience suivante présentée, est une NOESY. La carte complète est présentée en figure III.34. Deux agrandissements sont détaillés en figure III.35.

Cette carte NOESY nous donne de précieuses informations de structure puisque le signal imino présent à 13 ppm présente des taches de corrélations. D'après les simulations du DINAMelt Web Server (dimère présenté dans la partie DINAMelt Web Server, III.2, car bases nucléiques identiques au PNA 5) nous numérotons ce PNA pour donner des éléments d'attribution : $T_1G_2C_3C_4G_5G_6T_7T_8C_9C_{10}$. Le proton relatif à l'appariement T-G visible à 12,1 ppm est attribué à **H1** de G_2 . Le signal à 13 ppm indique les protons **H1** de G_5 et **H1** de G_6 . Ces derniers signaux corrélient avec des protons **H5** de C_3 et **H6** de C_4 avec lesquels ils sont appariés, voir figure III.35. De même, nous notons une corrélation entre **NH**₂ de C_3 et C_4 à 7,1 ppm avec les protons **H1** des bases G . Le PNA 7 semble bien former un dimère conforme à la simulation.

Les expériences complémentaires réalisées ne sont pas présentées ici puisqu'elles n'apportent pas d'information supplémentaire. Seules ces quelques signaux ont pu être attribués concernant le PNA 7.

PNA 8 : Le PNA 8 est un PNA ramifié comportant trente bases nucléiques. Son spectre 1D ^1H Jump & Return est présenté en figure III.36. Le spectre du PNA 8 montre la présence de nombreuses impuretés (graisse, ammonium, alcool tertiaire, solvants...). Sur l'agrandissement, les signaux de notre PNA sont ceux présents sous forme de pics fins, et peu intenses. Notons le proton **H8** des bases

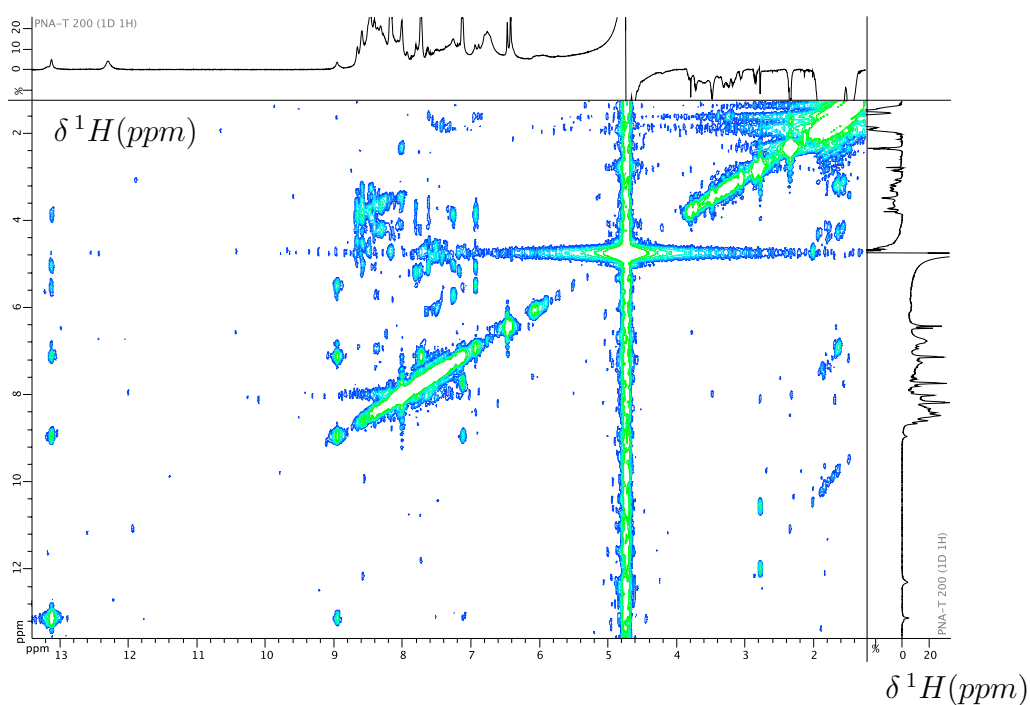


FIGURE III.34 – Spectre 2D ^1H - ^1H NOESY du PNA 7 réalisé à 700 MHz, $[\text{Z}]=1,71$ mM, $[\text{Phosphate}]=15$ mM, $T=313\text{K}$, $\text{NS}=64$, temps de mélange = 400 msec.

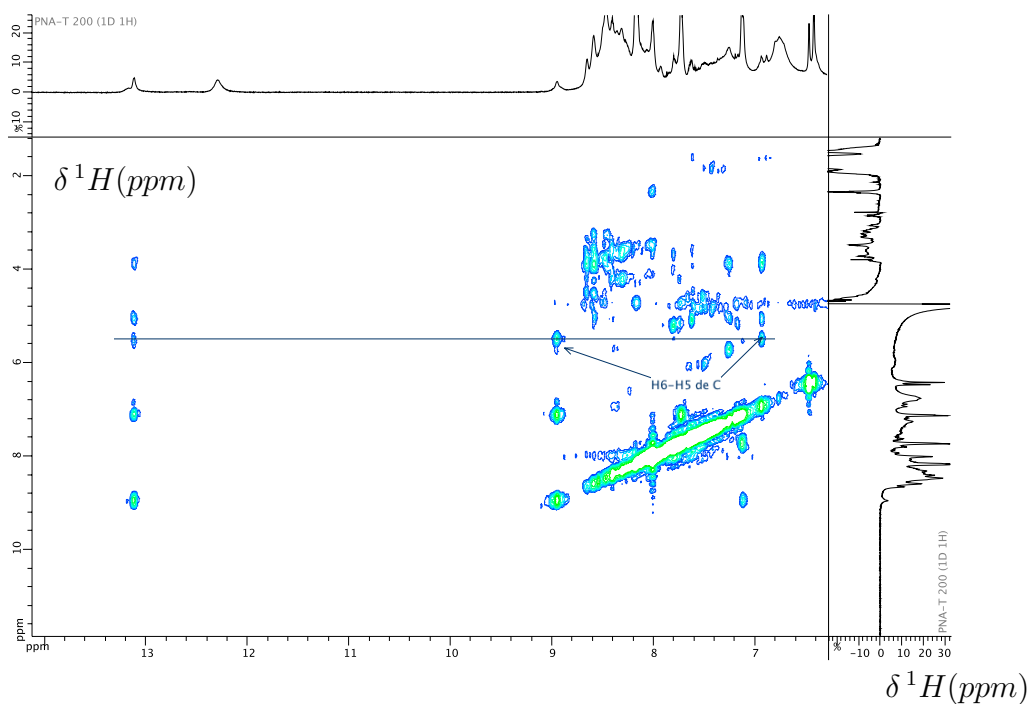


FIGURE III.35 – Agrandissement du spectre 2D ^1H - ^1H NOESY du PNA 7 réalisé à 700 MHz, $[\text{Z}]=1,71$ mM, $[\text{Phosphate}]=15$ mM, $T=313\text{K}$, $\text{NS}=64$, temps de mélange = 400 msec.

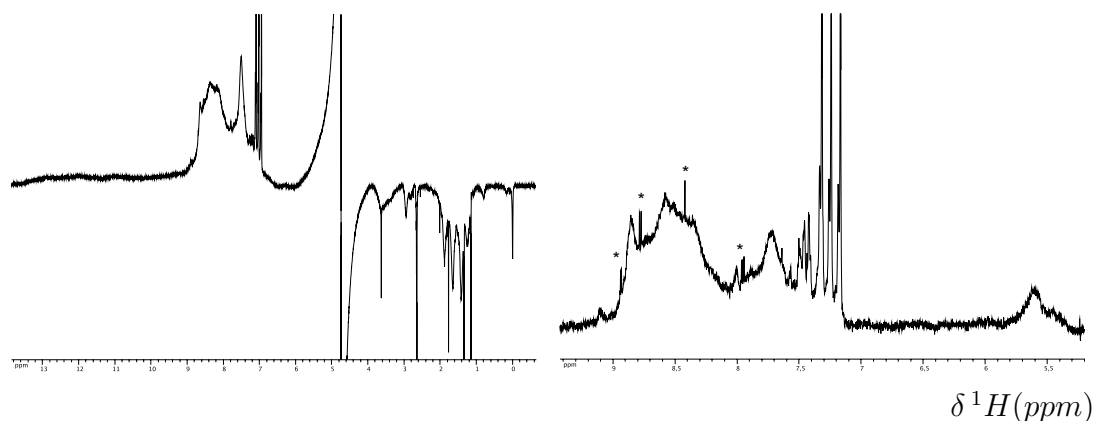


FIGURE III.36 – Spectre 1D ^1H , zgjr du PNA 8 réalisé à 700 MHz, $[\text{8}] = 0,5 \text{ mM}$, $[\text{Phosphate}] = 0 \text{ mM}$, $\text{pH} = 3$, $T = 303\text{K}$, $\text{NS} = 64$. Le spectre de droite est un agrandissement.

A résonnant à 8,41 ppm et le proton **H1** des bases *G* à 7,90 ppm. Et finalement, à 7,57 ppm est visible le signal du proton **H6** des *C*.

Les expériences supplémentaires de RMN menées sur ce PNA ne sont pas concluantes et ne sont pas présentées.

PNA 9 : Ce PNA présente des spectres RMN plus mauvais que le précédent : beaucoup d'impuretés présentes, signal RMN large, carte NOESY vide... Ce PNA est exclu de cette partie, aucun spectre ne sera détaillé.

PNA 11 : Ce PNA est un duplexe de PNA comportant 50 bases nucléiques.

Le spectre 1D ^1H Jump & Return est visible en figure III.37. De nombreux protons imino sont visibles ici, deux types de protons imino G-T résonnent à 11,7 ppm et 12,1 ppm, deux protons G-C résonnent à 13,1 et 13,2 ppm. Un signal non attribué résonne à 12,6 ppm, et nous devinons un signal A-T à 14,1 ppm. Pour définir avec plus de précision les attributions de ces protons imino, notamment le signal indéterminé à 12,6 ppm, nous faisons varier la température. Ces spectres sont présentés en figure III.38. Il est à noter que ces spectres sont enregistrés avec beaucoup plus de scans que le spectre 1D précédent (2048 versus 256).

Contrairement aux précédents spectres RMN de PNA, les signaux relatifs aux protons imino ne disparaissent pas avec l'élévation de la température. Les signaux s'affinent à plus haute température et deviennent plus visibles. Le signal non attribué ne peut toujours pas l'être. Cependant le PNA 11 est un duplexe du PNA 7 et du PNA 8. Nous devrions alors ne trouver sur le spectre RMN que des appariements complémentaires Watson-Crick et Hoogsteen (C-G ou C⁺-G et A-T). Soit 6 paires A-T et 14 paires G-C par duplexe formé. Or des appariements de type Wobble (T-G) sont recensés sur le spectre RMN. Ceci est le signe de mésappariements, le duplexe n'est pas sous sa forme attendue. Il peut avoir formé un homodimère à partir des brins A restés libres, car seuls les brins B sont normalement complexés.

Une carte 2D NOESY est présentée en figure III.39. Sur cette carte RMN, il est difficile d'attribuer clairement les protons aux bases nucléiques car les signaux

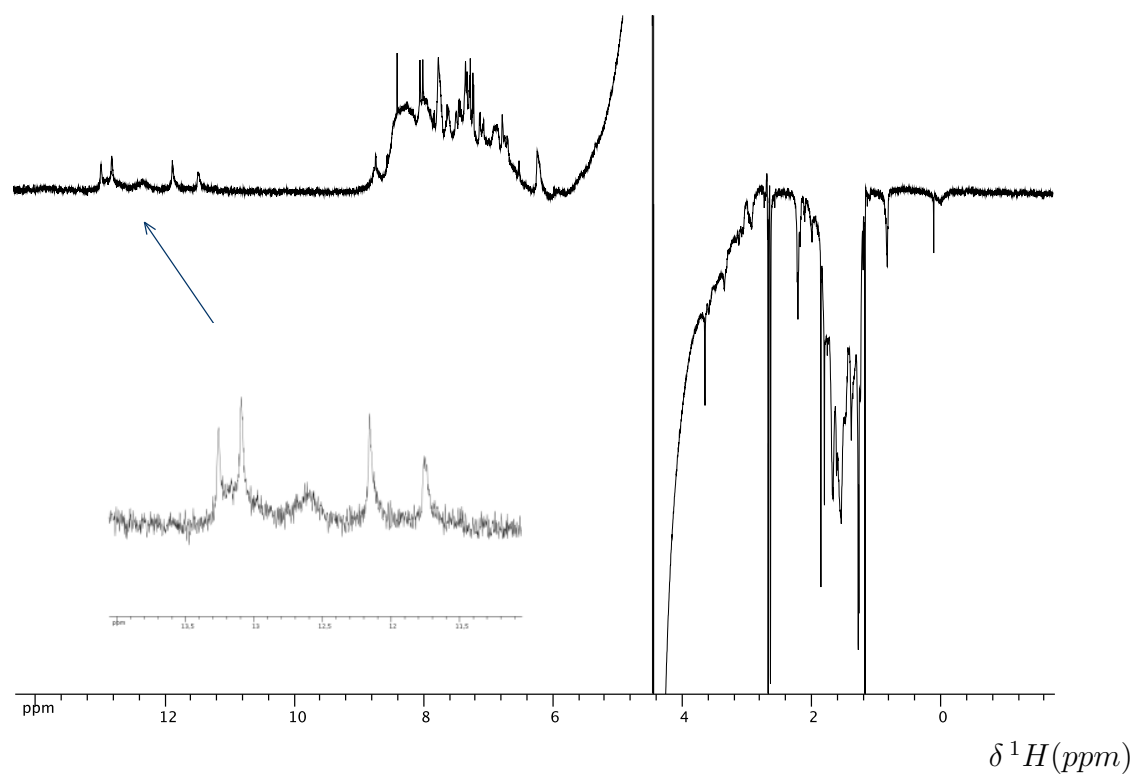


FIGURE III.37 – Spectre 1D ^1H , zgjr du PNA 11 réalisé à 700 MHz, $[\text{11}] = 0,2 \text{ mM}$, $[\text{Phosphate}] = 10 \text{ mM}$, $T = 323 \text{ K}$, $\text{NS} = 256$, temps de mélange = 400 msec.

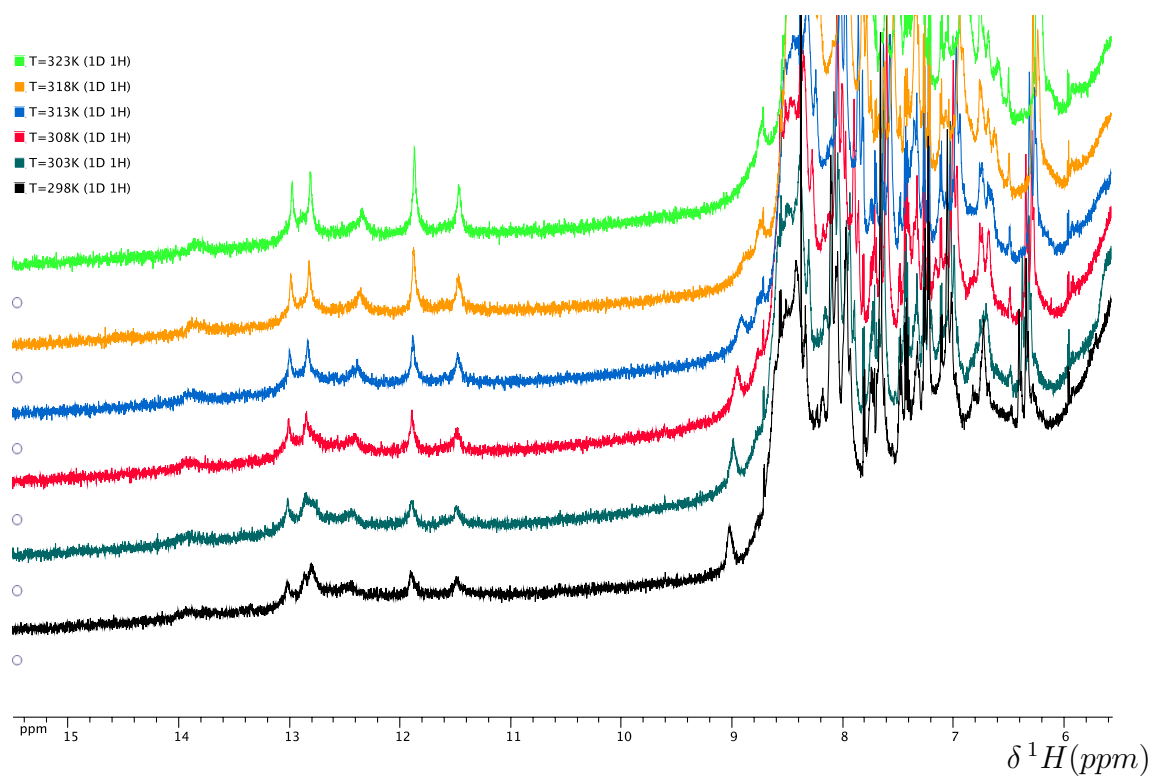


FIGURE III.38 – Spectres 1D ^1H , zgjr du PNA 11 réalisé à 700 MHz, $[\text{11}]=200\ \mu\text{M}$, $[\text{Phosphate}]=10\ \text{mM}$, $\text{NS}=2048$. Température variable de 298K (en bas) à 323K (spectre du haut).

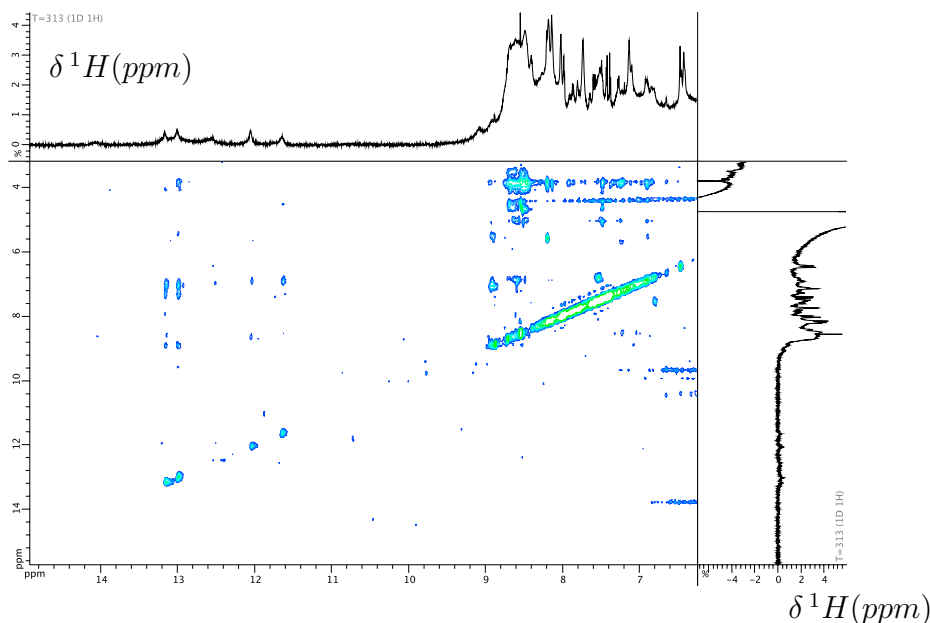


FIGURE III.39 – Spectre 2D ^1H - ^1H NOESY du PNA 11 réalisé à 700 MHz, $[\text{11}] = 200 \mu\text{M}$, $[\text{Phosphate}] = 10 \text{ mM}$, $T = 313\text{K}$, $\text{NS} = 256$, temps d’acquisition : 1jour.

sont peu intenses et proches du bruit. La corrélation à 12,9/7,2 ppm pourrait être un proton imino de base G-C qui indiquerait alors en NOE le proton **H6** d’une base *C*. Les corrélations 12,9/8,9 ppm et 13,1/8,9 ppm peuvent être synonyme d’une interaction avec un proton **H8** des bases *A* à 8,9 ppm, ou simplement une tache NOE avec un proton échangeable résonnant ici. Une HSQC pourrait être utile pour éclaircir ce point, malheureusement elle n’a pas fonctionné ici.

Nous ne pourrions aller plus loin dans l’attribution de ce PNA. La DOSY de ce PNA est présenté en annexe G.10. Cette expérience indique la présence des composés 7 et 8 mis en excès lors de la formation du duplexe, et quelques impuretés légères.

PNA 12 : Ce PNA est aussi un duplexe, il est similaire au PNA précédent et possède 50 bases nucléiques. Le spectre 1D ^1H Jump & Return du PNA 12 a été présenté en annexe G.1. Il présente de nombreux signaux au delà de 11 ppm, et des signaux fins superposés dans un ou plusieurs signaux larges dans la zone 6-8 ppm. La variation de température est présentée en figure III.40, sur le spectre de gauche est agrandie la région des protons imino. Le spectre de droite est un agrandissement de la région des protons aromatiques et amino.

Ici les protons imino sont difficilement attribuables, cette région du spectre semble similaire au duplexe précédent. Les signaux protons au delà de 12 ppm s’affinent dès que la température augmente. La séquence de RMN NOESYjr est donc enregistrée, le spectre est présenté en figure III.41.

La carte ressemble étrangement à celle du PNA 11. Nous notons ici la présence de corrélations émanant des protons imino. Ainsi le signal présent à 11,6 ppm est attribué à un appariement Wobble G-C tout comme le signal à 12,0 ppm. Ces deux signaux indiquent une corrélation avec un signal résonnant à 6,9 ppm attribué à

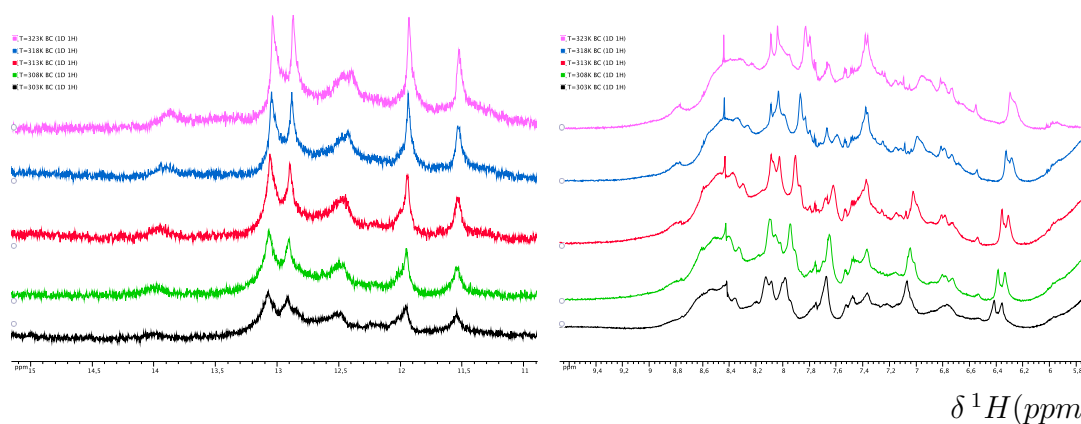


FIGURE III.40 – Spectres 1D ^1H , zgjr du PNA 12 réalisé à 700 MHz, $[\text{12}] = 200 \mu\text{M}$, $[\text{Phosphate}] = 10 \text{ mM}$, $\text{NS} = 512$. Température variable de 303K (en bas) à 323K (spectre du haut).

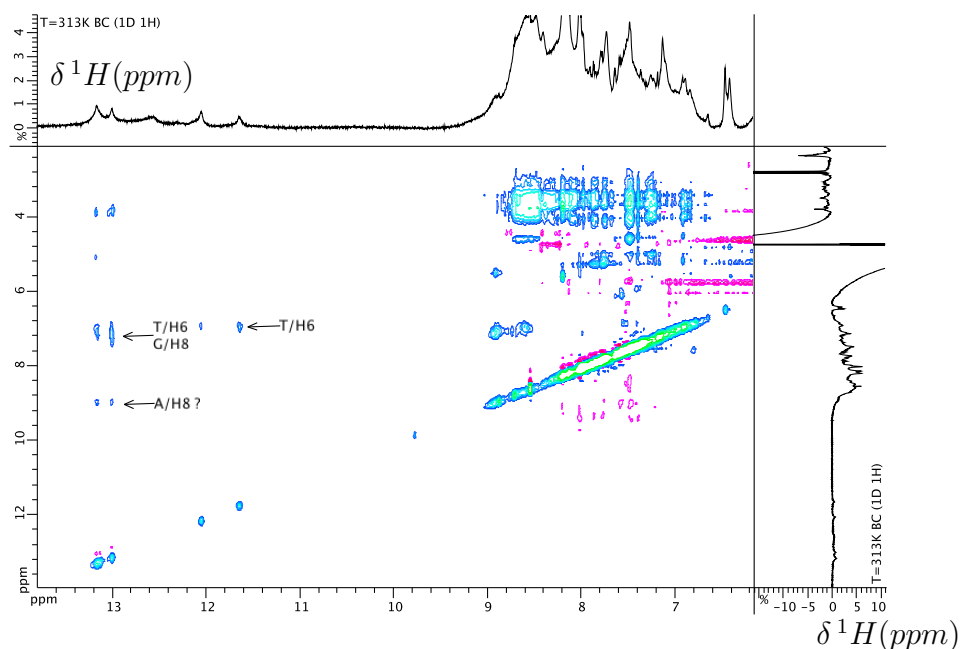


FIGURE III.41 – Spectre 2D ^1H - ^1H NOESY du PNA 12 réalisé à 700 MHz, $[\text{12}] = 200 \mu\text{M}$, $[\text{Phosphate}] = 10 \text{ mM}$, $T = 313\text{K}$, $\text{NS} = 320$, temps de mélange = 400 msec.

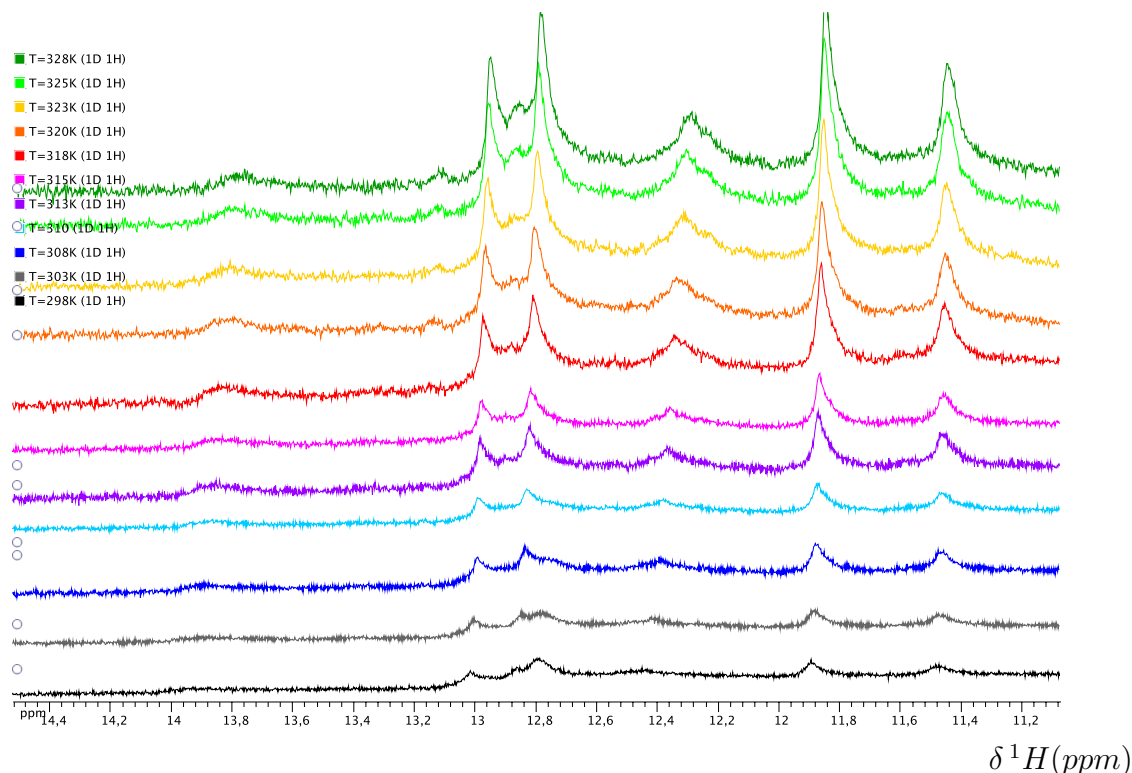


FIGURE III.42 – Spectres 1D ^1H , zgjr du PNA 13 réalisé à 700 MHz, $[\text{13}] = 100 \mu\text{M}$, $[\text{Phosphate}] = 10 \text{ mM}$, $\text{NS} = 2048$. Température variable de 298K (en bas) à 328K (spectre du haut).

un proton **H6** d'une base *T*. Les signaux résonnant à 13 et 13,5 ppm peuvent être des protons imino d'appariement G-C ou A-T. A ce titre les corrélations avec le proton présent à 7,1 ppm ne peuvent être précisément définies comme étant des protons **H8** des bases *G* ou des protons **H6** des bases *C*, voire des protons **H6** des bases *T*. Les corrélations 13,1/9,0 ppm et 13/8,9 ppm ne sont pas attribués de manière stricte à un proton **H8** d'une base *A*. La encore l'expérience 2D HSQC est manquante pour compléter ces informations. Mais les appariements G-C présents indiquent la présence de mésappariements au sein du mélange.

Les expériences de 2D TOCSY n'ont pas apporté d'informations supplémentaires, elles sont présentées en annexe G.11 et G.12 selon le temps de mélange lors de l'acquisition.

PNA 13 : Ce PNA est le triplexé formé à partir des PNA 12 et 13 en quantité équimolaire. Il est à noter qu'après sa formation ce complexe est de nature différente des autres PNA. Il a tendance à "mousser" et sa viscosité semble différente. L'étude de ce PNA est effectuée à pH neutre. Le spectre 1D Jump & Return du PNA 13 a été présenté en annexe G.1. Un agrandissement de la région 11-14 ppm est montré en figure III.42, l'expérience est enregistrée à diverses températures.

Sur ce spectre sont présents six différents signaux pouvant correspondre à des protons imino. Par comparaison avec les deux derniers duplexes, le même phéno-

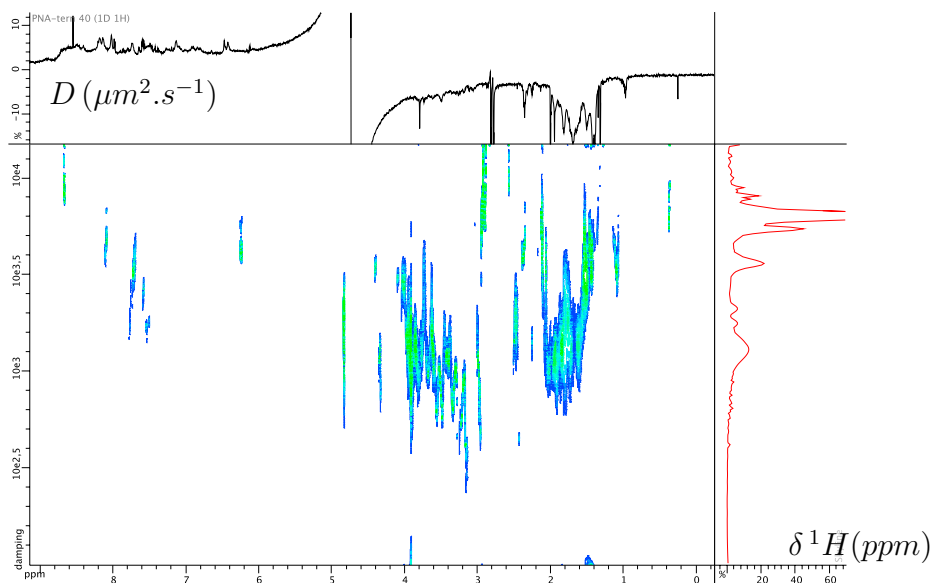


FIGURE III.43 – Spectre 2D DOSY du PNA 13 réalisé à 700 MHz, $[13]=100\ \mu\text{M}$, $[\text{Phosphate}]=10\ \text{mM}$, $T=313\text{K}$.

mène est observé, les signaux imino s'affinent avec la hausse de température. Les résonances correspondantes aux appariements G-C entre 11,4 ppm et 12 ppm deviennent plus importantes à haute température. Le phénomène inverse est observé sur les plus petits PNA, les appariements G-C sont beaucoup moins stables à haute température et disparaissent avec l'élévation de la température. Ici ils sont comme renforcés à haute température. Ceci peut être le signe que les mésappariements présents se rompent au profit des complexes complémentaires (G-C et A-T).

L'expérience de 2D DOSY laisse deviner un mélange de divers composés de poids moléculaire variable. Le spectre est présenté en figure III.43. Aucune information sur le PNA 13 ne peut être tirée de cette expérience de DOSY.

L'expérience de NOESY laisse entrevoir peu de signal, et nous constatons une étrange similitude avec le PNA 12. Cette 2D est présentée en figure III.44. Les mêmes informations que pour le PNA 12 peuvent être données, mais il semble peu convainquant que nous soyons en présence du triplex 13. Il s'agit probablement du PNA 12 non apparié avec le PNA 11. En témoigne la comparaison des spectres 1D de 12 et 13 présenté en figure III.45.

Les autres expériences 2D réalisées n'apportent pas d'information car elles sont faiblement fournies. Il y a peu de taches corrélations et elles sont proches du bruit. Nous ne concluons pas sur la réelle présence du triplex en solution, l'analyse par RMN ne permet pas de confirmer sa présence.

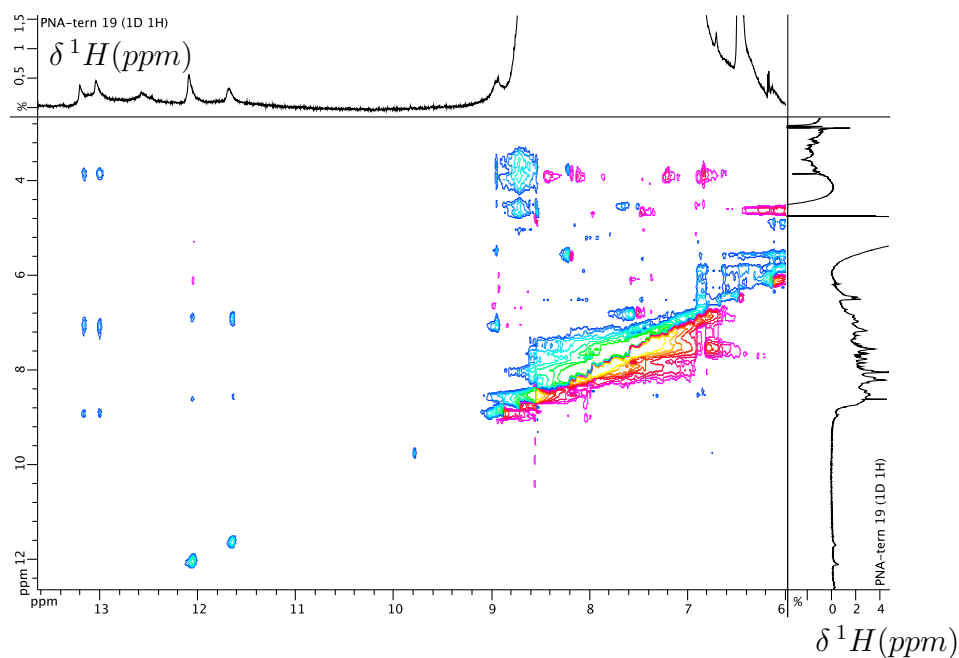


FIGURE III.44 – Agrandissement du spectre 2D ^1H - ^1H NOESY du PNA 13 réalisé à 700 MHz, $[\underline{13}] = 100 \mu\text{M}$, $[\text{Phosphate}] = 10 \text{ mM}$, $T = 313\text{K}$, $\text{NS} = 576$, temps de mélange : 400 msec, temps d'expérience : 20h.

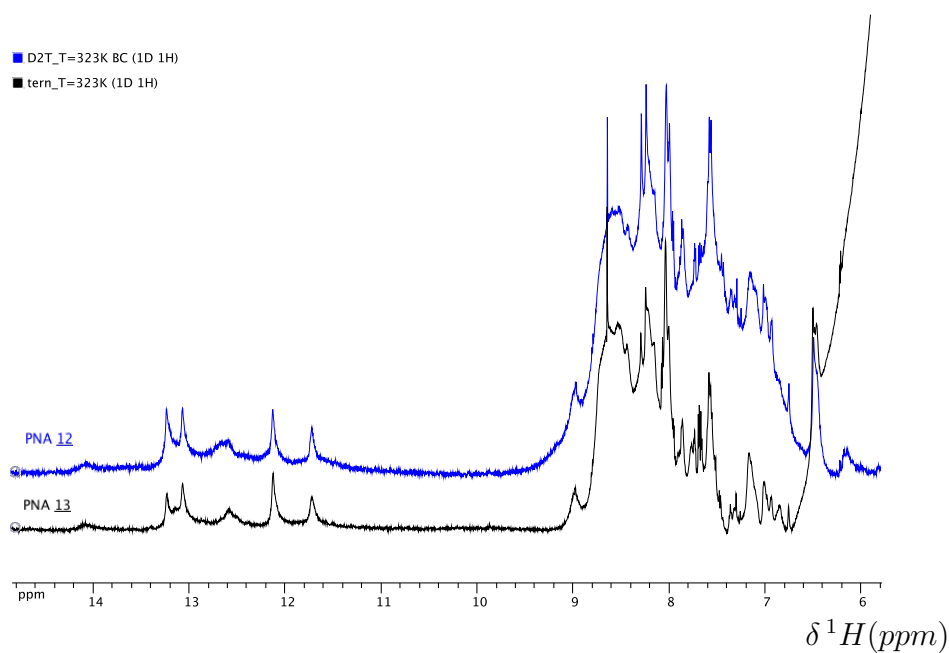


FIGURE III.45 – Spectres 1D ^1H , zgjr du PNA 13 et du PNA 12 réalisés à 700 MHz, $[\underline{13}] = 100 \mu\text{M}$, $[\underline{12}] = 200 \mu\text{M}$, $[\text{Phosphate}] = 10 \text{ mM}$ chaque, $T = 323\text{K}$, $\text{NS} = 2048$.

III.4 Mesures biophysiques additionnelles

Après cette étude par RMN, de nombreux paramètres concernant nos PNA sont manquants. Dans le but d'obtenir des informations structurales supplémentaires sur les PNA, nous réalisons des mesures de dichroïsme circulaire. La température de fusion, précédemment abordée, est recherchée à l'aide de mesures d'absorbance et également par dichroïsme circulaire. Ces mesures de dichroïsme circulaire et d'absorbance sont enregistrées sur un spectropolarimètre de Type Jasco J-815.

III.4.1 Hyperchromicité, température de fusion et structure secondaire

L'hyperchromicité (ou effet hyperchrome) est la propriété des acides nucléiques à absorber dans l'Ultra-Violet lors de la dénaturation (hausse de la température). Au cours de la dénaturation de deux brins d'acide nucléique, la température de fusion, T_m , représente le point pour lequel la moitié des brins sont associés (ou dissociés). Suivre le signal d'absorbance en fonction de la température donne accès à T_m et par conséquent au suivi de la dénaturation (ou des appariements). Pour un polymère nucléique, l'absorbance est faible si celui-ci est structuré, et augmente lors de la perte de structure secondaire (dénaturation). Cet effet est engendré par les appariements Watson-Crick, Hoogsteen ou Wobble présents au sein de la solution étudiée. Plus le taux de liaisons Watson-Crick (G-C) est élevé, plus la température de fusion est importante. Par ailleurs, plus une molécule possède de bases nucléiques, plus sa température de fusion sera élevée. Nous allons nous servir de ce phénomène d'hyperchromicité pour estimer les températures de fusion de nos PNA, mais aussi pour suivre l'évolution des appariements observés par RMN.

La détermination du T_m se fait par la mesure de l'absorbance en fonction de la température, voir figure III.46 courbe de droite. Dans un premier temps, nous mesurons l'absorbance en fonction de la longueur d'onde (de 400 nm à 190 nm), voir figure III.46 courbes de gauche.

Ces courbes nous aident à choisir plusieurs longueurs d'ondes pour procéder aux expériences de détermination de température de fusion. Des points d'intérêt sont choisis, tels les pics d'absorbance, et aussi un point où l'absorbance est quasi nulle, ici vers 250-300 nm. Les expériences sur les PNA sont réalisées dans une gamme de température comprise entre 35°C et 90°C, à une longueur d'onde de 350 nm, 280 nm, 262 nm, 240 nm et 218 nm concernant les PNA 4, 5, 6 et 10. Les PNA 7, 8, 9, 11, 12 et 13 sont analysés à 250 nm, 215 nm, 207 nm et 200 nm.

Prenons comme exemple le PNA 12. C'est le duplexe formé à partir des PNA 7 et 9. D'après la matrice des températures de fusion théoriques obtenues via le DINAMelt Web Server, ces deux PNA (brins B' et B de la matrice) ont un T_m de 69°C. Sur la figure III.46, à droite, est présenté l'absorbance du PNA 12 en fonction de la température à 207 nm. La courbe est dessinée après correction du blanc (tampon phosphate). Trois points d'inflexion sont présents ici, aucun T_m précis ne peut être donné pour cet échantillon. La dénaturation du PNA 12 passe, *a priori*, par plusieurs étapes. La première étape de changement conformationnel débute à une température de 74°C. Nous observons un effet coopératif pour ce

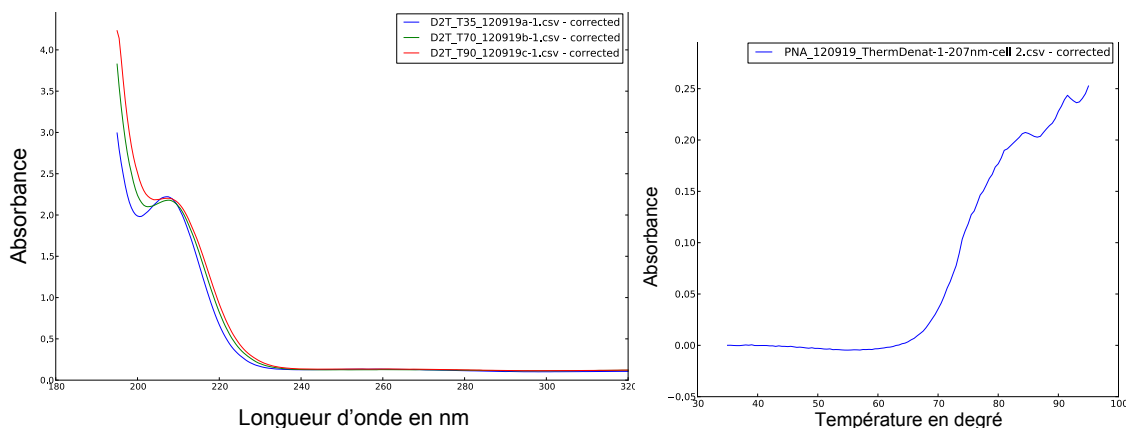


FIGURE III.46 – Gauche : Courbes de mesure du signal d'absorbance du PNA 12 en fonction de la longueur d'onde à 35°C en bleu, 70°C en vert et 90°C en rouge. Droite : Courbe de mesure du signal d'absorbance du PNA 12 en fonction de la température à 207 nm.

PNA. Puis, la courbe varie beaucoup pour définir une température de changement structural. En considérant le premier saut comme le T_m théorique, il apparaît proche du T_m expérimental, 69°C versus 74°C. Mais la courbe étant de forme particulière, il faut manier ce résultat avec précaution.

En figure III.47 sont regroupées les courbes, des PNA 7, 8, 12 et 13, de la mesure d'absorbance en fonction de la température lors de la dénaturation. Sur ces courbes, il est très difficile de tirer une valeur de température de fusion, nous n'obtenons pas des courbes avec un point d'inflexion franc et clair (comme celui du PNA 12 vu juste à l'instant, re dessiné sur les courbes pour comparaison). Ici l'effet coopératif des PNA 7, 8 et 13 est moins important que pour le PNA 12. L'analyse du PNA 8 n'apporte aucune information, les variations d'absorbance sont très faibles, et le signal tend à diminuer avant de ré-augmenter. La courbe du PNA 11 ne permet pas de déterminer un T_m . Concernant le PNA 13, nous pouvons estimer une "possible" T_m à 68°C. Pour rappel, le PNA 13 est formé à partir des PNA 11 et 12 (eux mêmes formés des PNA 7, 8 et 9). Dans la matrice du DINAMelt Web Server, la notation A et A' correspond à la dénaturation du triplexe en deux duplexes (PNA 11 et 12). La dénaturation de ces duplexes en simple PNA correspond aux brins B' et B de la matrice. La matrice de T_m nous indique une température de fusion théorique de 70,4°C pour la dénaturation du triplexe, puis 69°C pour la dénaturation du duplexe. Or un seul saut est "visible", à 68°C. A ce stade nous ne pouvons confirmer de manière stricte s'il est dû à la dénaturation du triplexe ou à celle des deux duplexes. Ces résultats sont à manipuler avec précaution.

III.4.2 Mesures de Dichroïsme Circulaire

Le Dichroïsme Circulaire (CD, *Circular Dichroism*) est une méthode spectroscopique basée sur la capacité que possèdent les structures chirales à absorber inégalement la lumière polarisée circulairement à droite de celle polarisée circulairement à

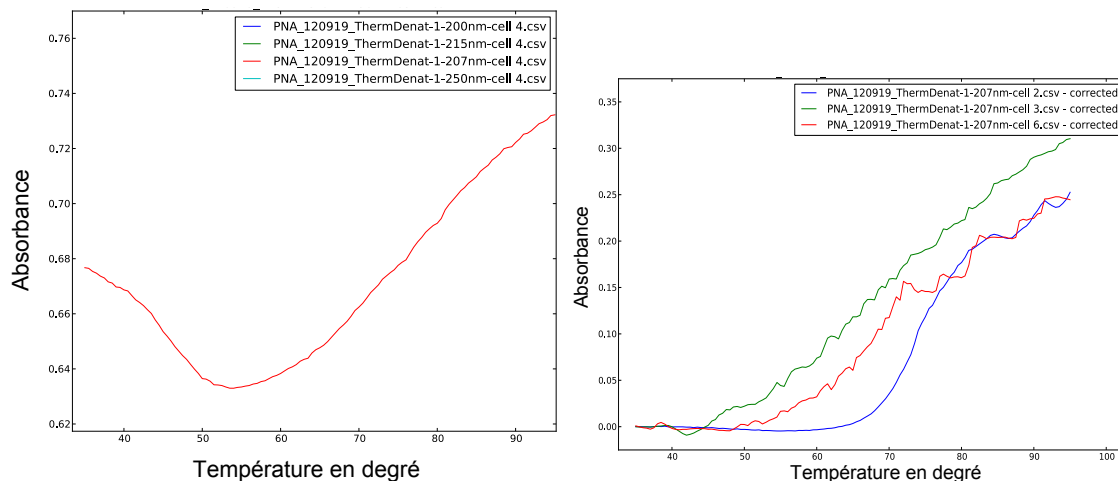


FIGURE III.47 – Gauche : Courbe du signal d’absorbance en fonction de la température du PNA 8 lors de la dénaturation à 207 nm. Droite : Courbes de mesure du signal d’absorbance des PNA 7 en vert, 12 en bleu et 13 en rouge, en fonction de la température à 207 nm.

gauche. Une lumière émise par une lampe au Xénon est envoyée vers un polariseur. Elle est alors modulée en lumière polarisée circulairement à droite et à gauche. Le faisceau passe ensuite au travers de l’échantillon optiquement actif qui va absorber préférentiellement l’une des deux ondes polarisée circulairement. Finalement, un détecteur va mesurer l’absorption différentielle dichroïque.

Pour cela, il faut donc que la molécule étudiée possède un ou plusieurs centres de chiralité. C’est le cas ici pour quelques uns de nos PNA avec l’insertion de γ -pseudo-sérines sur le squelette. Cette technique est utilisée pour la détermination du repliement des protéines, la caractérisation de structures secondaires [Saxena 1971] (on parle de chiralité de structure secondaire), [Magar 1971], et le changement conformationnel lors d’interactions entre protéines ou ADN/PNA [Huang 2004], [Faccini 2008]. La chiralité de structure secondaire est très utilisée pour l’étude des protéines et de l’ADN. Elle permet par exemple de déterminer la structure secondaire d’une protéine selon le schéma présenté en figure III.48. Une molécule possédant une structure secondaire va fournir un signal dichroïque différent d’une molécule qui a une structure aléatoire. Il est alors possible de déterminer une structure via les mesures de dichroïsme circulaire. Nous allons utiliser cette méthode dans le but de recueillir des informations structurales et des températures de fusion.

Les échantillons 1, 2, 3 et 7 ne présentent pas de centres chiraux, ils ne seront pas analysés par dichroïsme circulaire.

Le PNA 11 n’a pu être étudié par CD en raison de sa faible quantité d’échantillon.

Les PNA 8, 9, 12 et 13 n’ont fourni aucune réponse significative en dichroïsme circulaire, ils sont exclus de cette étude.

Les PNA 4, 5, 6, 10 ont donné des résultats exploitables par dichroïsme circulaire et absorbance. Leurs courbes de mesure du signal dichroïque à 280 nm en fonction

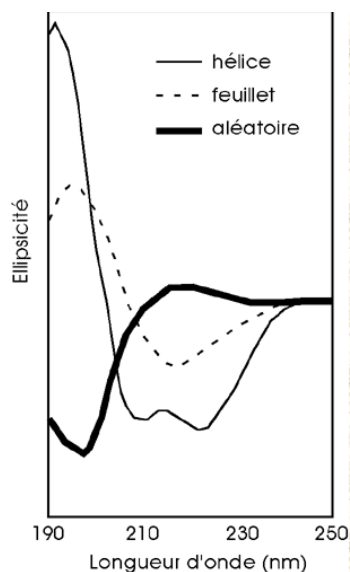


FIGURE III.48 – Courbes de dichroïsme circulaire caractéristiques des protéines pour la détermination de structure secondaire.

de la température sont présentées en figure III.49. Les courbes réalisées à d'autres longueurs d'onde concernant les PNA 5 et 10 sont présentées en annexe H.1.

A partir de ces courbes, nous constatons que le PNA 4 subit une variation de l'ellipticité plus importante que les trois autres PNA. Les PNA 5 et 6 ont un comportement similaire, leurs courbes évoluent de la même manière. Le PNA 10 possède quant à lui une ellipticité plus élevée dès le départ, et la forme croissante est quelque peu similaire à ceux des PNA 5 et 6. Pour rappel, le PNA 10 est le duplexe des PNA 5 et 6. A l'aide de l'outil d'analyse de ces courbes sur le logiciel du spectromètre Jasco, nous pouvons retirer une température de fusion expérimentale. Ainsi, T_m du PNA 4 = 83°C, le T_m du PNA 5 = 84,5°C, le T_m du PNA 6 = 85°C, et enfin le T_m du PNA 10 est indiqué supérieur à 88°C sans valeur précise. Ces résultats sont présentés en figure III.53 et discutés ci-après.

III.4.3 Analyse de la structure secondaire

Dans le but de déterminer la structure secondaire des PNA, nous enregistrons des courbes de dichroïsme circulaire en fonction de la longueur d'onde. La longueur d'onde mesurée est comprise entre 190 nm et 400 nm. Seuls les PNA engendrant des résultats probants sont présentés ici, tous ne seront pas détaillés, au vu de leur intérêt limité.

Ces exemples concernent le PNA 5, figure III.50 courbes de gauche, et le PNA 10, figure III.50 courbes de droite, qui présentent les résultats les plus flagrants. Est représentée la réponse en signal dichroïque en fonction de la longueur d'onde. Les courbes rouges sont enregistrées à 35°C après préparation de l'échantillon, puis les courbes vertes sont recueillies à 90°C.

Enfin, après dénaturation, les courbes bleues sont enregistrées de nouveau à 35°C. Il apparaît sur ces images la présence d'une structure secondaire à 35°C qui n'existe plus à haute température. Le phénomène est réversible puisque la courbe à

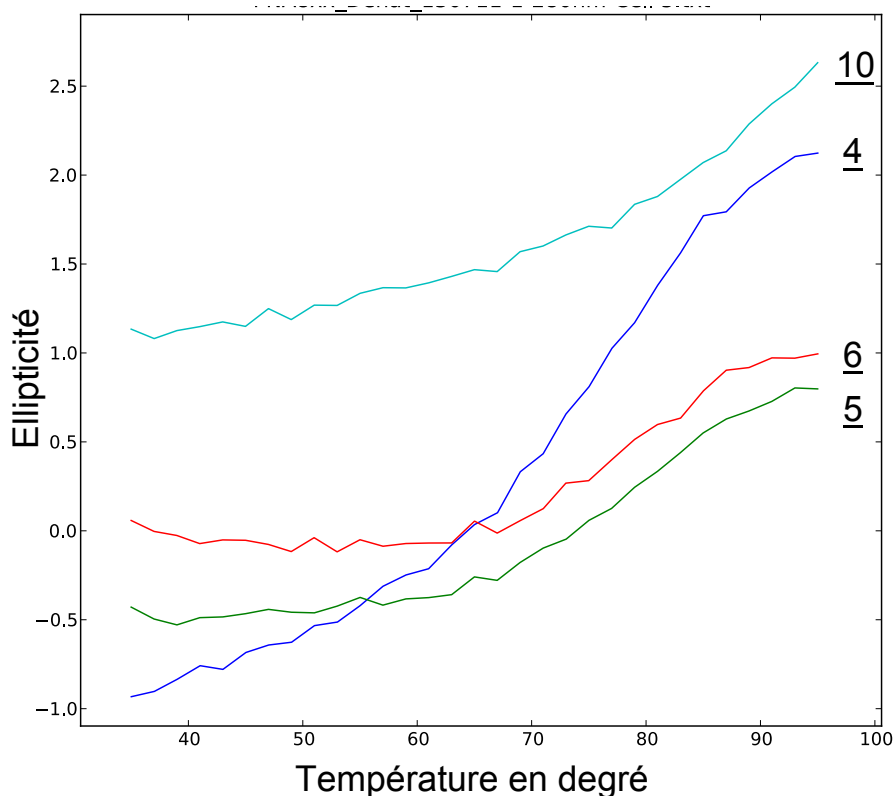


FIGURE III.49 – Evolution du signal de dichroïsme circulaire des PNA 4, 5, 6 et 10 à 280 nm en fonction de la température.

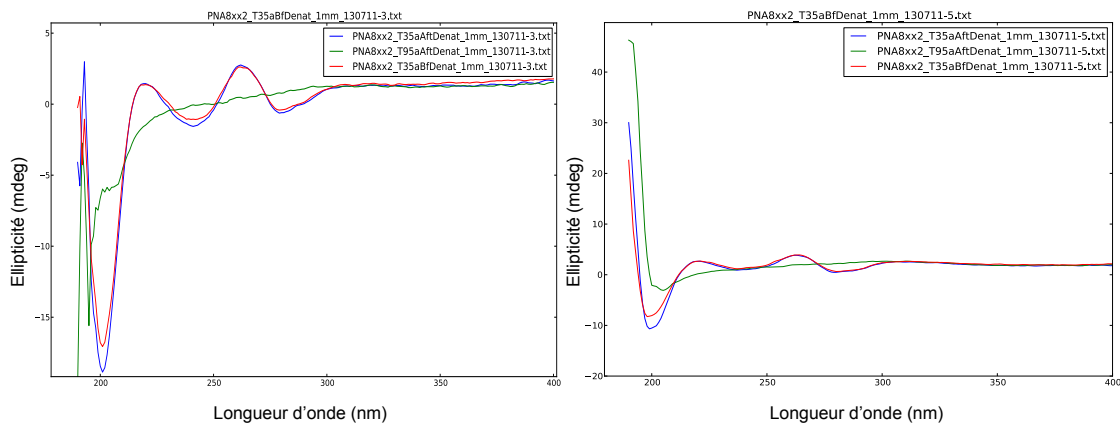


FIGURE III.50 – Courbes de dichroïsme circulaire du PNA 5 à gauche et 10 à droite en fonction de la longueur d’onde. Mesures effectuées à 35°C (courbes rouge) puis à 90°C (courbes verte) et de nouveau à 35°C (courbes bleue) après le cycle de température.

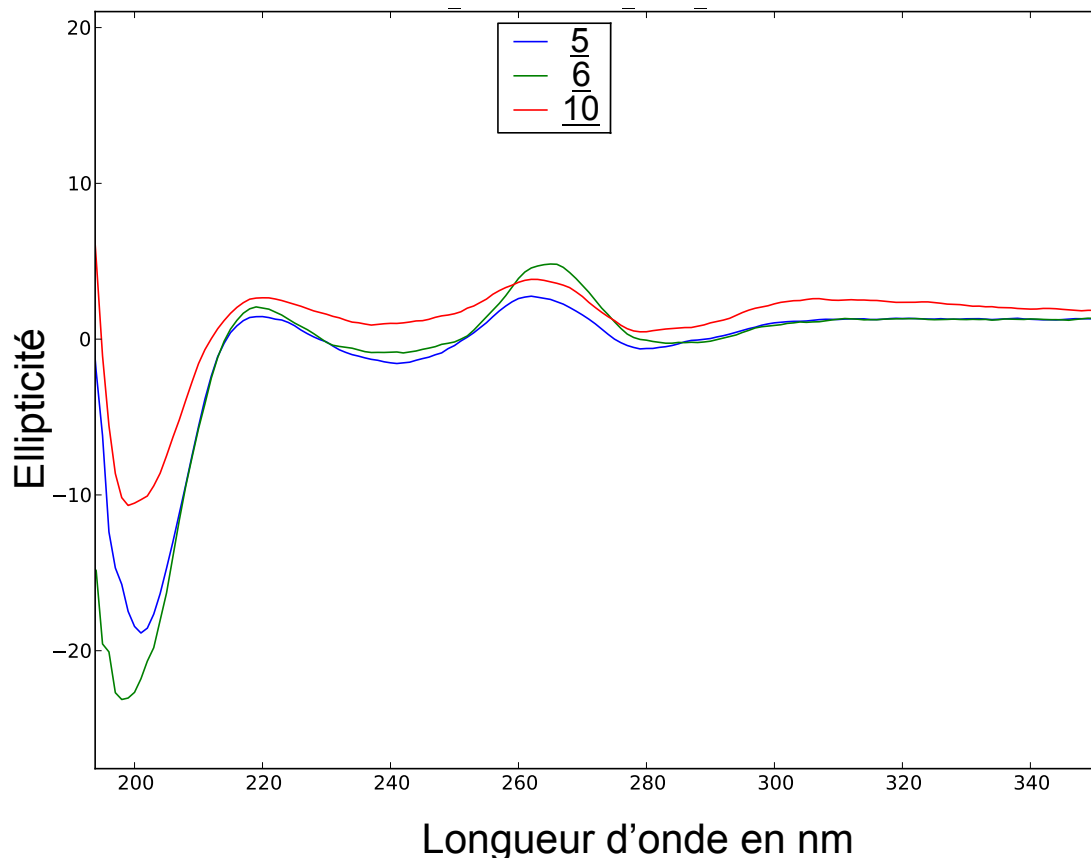


FIGURE III.51 – Courbes de dichroïsme circulaire des PNA 5 en bleu, du PNA 6 en vert et 10 en rouge, en fonction de la longueur d'onde. Pour rappel le PNA 10 est formé des PNA 5 et 6.

35°C après dénaturation est quasi identique à celle réalisée en début d'expérience. La structure secondaire du PNA redevient identique aussi bien pour le PNA 5 que concernant le PNA 10. Ces mesures de dichroïsme circulaire indiquent clairement que la présence de pseudo-sérines induit une chiralité structurale sur le squelette du PNA apparié.

Ces deux PNA présentent cependant des courbes différentes caractérisant deux structures secondaires non similaires. Le PNA 5 et le PNA 6 forment le duplexe 10, ils sont tous trois représentés sur la même figure III.51.

Les PNA linéaires 5 et 6 ne présentent pas exactement les mêmes courbes de signal dichroïque, la longueur d'onde présentant le maximum de signal CD est légèrement différente. Elles sont globalement similaires. Par contre, leurs courbes divergent de celle du PNA 10, caractérisant une organisation structurale différente.

Le signal CD obtenu varie en fonction de la structure secondaire de la molécule étudiée et est global à la chiralité de la molécule. Il ne fournit pas de réponse précise quant à la structure propre du PNA, mais nous informe sur la présence de structures secondaires similaires en cas de courbes CD identiques. Ici, le duplexe 10 possède une structure secondaire distincte de celles des PNA 5 et 6 qui le composent.

La courbe de réponse en dichroïsme en fonction de la longueur d'onde du PNA 4

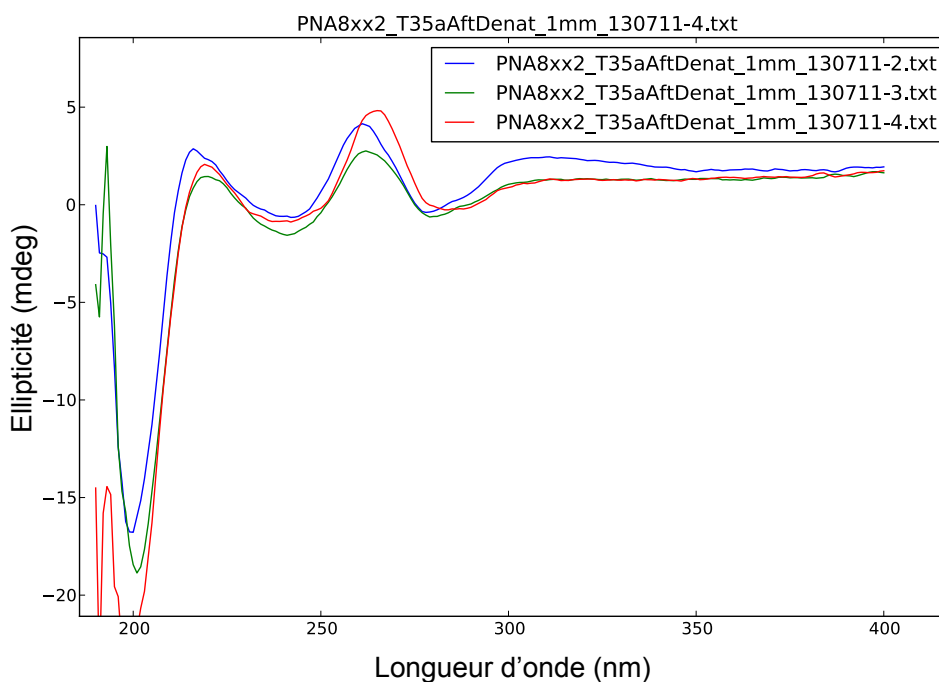


FIGURE III.52 – Courbes de dichroïsme circulaire des PNA 4 (courbe bleue), 5 (courbe verte) et 6 (courbe rouge) en fonction de la longueur d'onde. Mesures effectuées à 35°C après dénaturation.

est comparée à celles des PNA 5 et 6 étudiées précédemment. Elles sont regroupées en figure III.52. Le PNA 4 est un PNA plus court que 5 et 6, il ne porte que six bases nucléiques. Ainsi les PNA 5 et 6, courbes verte et rouge respectivement possèdent la même structure puisque leurs courbes dichroïques sont similaires. Le PNA 4, courbe bleue, présente quelques légères différences.

Les valeurs d'ellipticité sont souvent plus élevées pour le PNA 4. Leurs maximums sont présents à des longueurs d'ondes légèrement plus faibles que pour les PNA 5 et 6. Cependant, la forme globale du signal CD reste la même. Nous concluons alors sur le fait que ces trois PNA possèdent probablement la même hélice "chirale". Le PNA 4 qui est plus court que les PNA 5 et 6 possèdent la même conformation, à l'instar du PNA 10 vu précédemment. Aucune autre conclusion concernant une structure secondaire particulière ne peut être tirée de ces seules courbes.

A la vue des structures de ces PNA il apparaît compréhensible que les PNA 5 et 6 présentent des similarités d'organisation structurale car ces PNA possèdent, tous deux, dix bases nucléiques. Le PNA 4 n'en possède quant à lui seulement six. Sa structure peut différer lors de la formation d'homoduplexes, puisque les formations d'hairpin ne semblent pas favorisées. Voir la partie III.2 à propos du DINAMelt WebServer. Le T_m théorique des dimères du PNA 4 est de 35,8°C, or la mesure expérimentale ne permet pas de descendre en deçà de 35°C. Les courbes de dichroïsme circulaire du PNA 4 en fonction de longueur d'onde (et de la température

à 218 nm) sont présentées en annexe H.2.

Les PNA 5 et 6 peuvent former des hairpin ou des homodimères. Le T_m théorique de l'homodimère du PNA 5 est de 50,8°C, celui du PNA 6 est de 25,4°C. L'homodimère de 6 est bien moins stable que celui du PNA 5, en témoignent le nombre d'appariements possibles du PNA 5, cf partie III.2 figure III.9. Pour information, le dimère du PNA 6 obtenu via le simulateur est présenté en annexe H.3. Les dimères des PNA 4 et 10 sont représentés en annexe H.4 et H.5 respectivement.

Comme vu précédemment, des valeurs expérimentales de température de fusion sont tirées de ces expériences de dichroïsme circulaire. Les T_m théoriques (DINAMelt Web Server) et expérimentaux sont regroupés dans le tableau suivant, figure III.53. Le PNA 10 n'est pas présenté dans ce tableau car il ne forme pas d'homodimères, (c'est le duplexe de 5 et 6) son T_m théorique est de 69°C (brins B et B' de la matrice III.10) tandis que le T_m expérimental est supérieur à 88°C.

	T_m théorique	T_m expérimental
PNA <u>4</u>	35,8	83
PNA <u>5</u>	50,8	84,5
PNA <u>6</u>	25,4	85,0

FIGURE III.53 – Température de fusion des homodimères des PNA 4, 5 et 6 valeurs théoriques et expérimentales en degré Celsius.

A la vue de ces résultats, nous remarquons de suite un certain décalage entre les valeurs expérimentales et théoriques. Il semblerait que les PNA soient bien plus stables en solution que des brins d'ARN (utilisé comme référence pour les T_m théoriques). Le squelette peptidique des PNA étant flexible, les appariements résultants s'avèrent très stables puisque la fusion est observée au delà de 80°C pour nos échantillons.

Il y a une inversion dans l'ordre des températures de fusion entre la prédiction par le DINAMelt Web Server et la mesure. Le PNA 6 présente la plus faible température de fusion théorique, tandis que le PNA 4 possède la plus faible mesure expérimentale. Nous nous attendons à un simple décalage des échelles, qui serait le signe d'une mauvaise évaluation des énergies (ΔG) d'interaction base-base misent en jeu. Cette inversion indique que d'autres mécanismes sont peut-être présents, et que des types d'appariement autres que ceux explorés par DINAMelt Web Server (correspondant aux ARN) seraient possibles pour les PNA. L'effet d'inversion peut aussi être dû à certaines interactions possible dans le squelette PNA ou entre le squelette et les bases nucléiques. En tout état de cause, cela relativise la matrice de Tm présentée figure III.10 et l'usage qui en a été fait.

Les mesures de signal dichroïque en fonction de la température ne montrent pas de différence quelque soit la manière dont la mesure est réalisée. La figure III.54 indique la réponse en CD en fonction de la température pour une mesure réalisée à température croissante (courbes "denat" bleue et rouge) et décroissante (courbes "cooling" vertes claire et foncée) sur le PNA 6. Les courbes sont superposables, seul un léger effet d'évaporation du solvant est visible au refroidissement (cooling, courbes rouge et bleue). Le signal tend à augmenter vers la fin de la mesure après

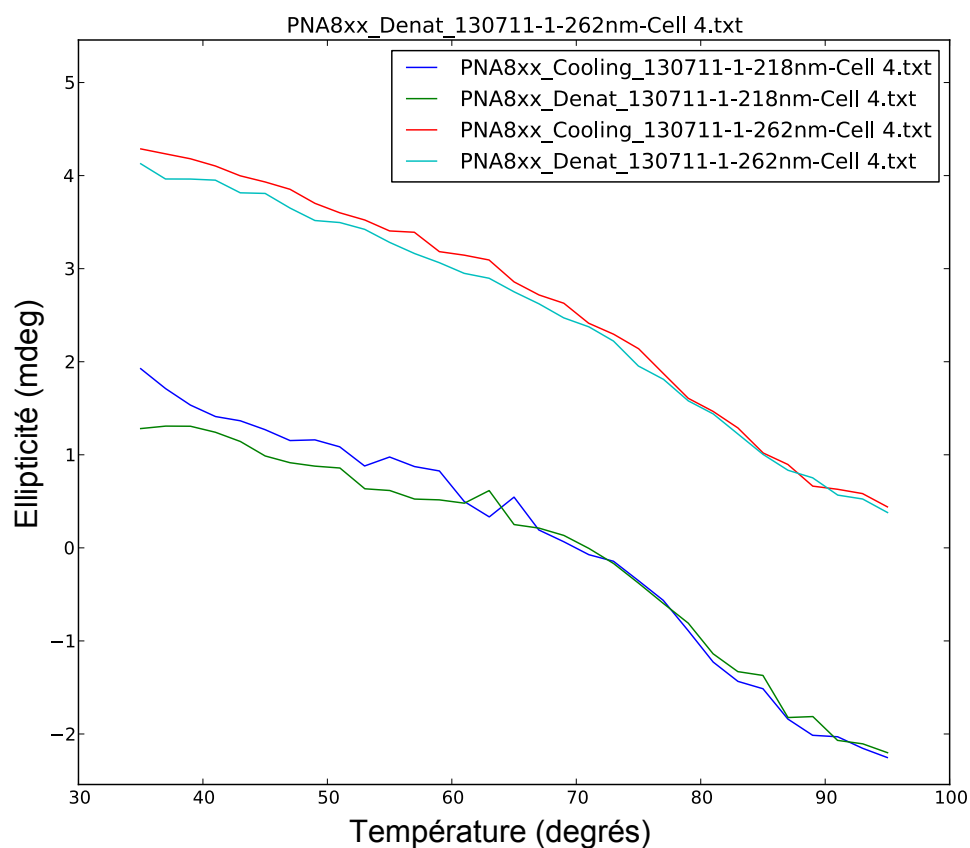


FIGURE III.54 – Evolution du signal de dichroïsme circulaire du PNA 6 à deux longueur d'ondes différentes en fonction de la température. Courbes rouge et bleue pour le refroidissement à 262 nm et 218 nm respectivement. Courbes vertes claire et foncée pour le cycle de chauffage à 262 nm et 218 nm respectivement.

perte d'un peu de solvant lors des mesures à haute température. Il n'y a pas de biais de mesure.

III.5 Conclusion

L'étude par RMN d'acide peptidique nucléique s'avère plus complexe qu'elle n'y paraît. Aucune attribution totale du squelette du PNA n'est obtenue, ce sont des molécules difficiles à synthétiser avec une grande pureté, ce qui pose quelques problèmes pour une technique sensible telle que la RMN.

L'analyse 1D proton **Jump & Return** apporte une précieuse information sur les PNA. Cette séquence de RMN, un peu particulière, est un moyen efficace d'observer les protons échangeables tout en éliminant le signal du pic d'eau. Sur les PNA, possédant plus de trois bases nucléiques ici, à l'aide de cette séquence, des signaux apparaissent au delà de 11 ppm. Ce sont des protons imino des appariements Watson-Crick, Hoogsteen et Wobble. Sur les spectres RMN des PNA, la présence de ces signaux nous informe de la formation d'appariements. Ainsi les PNA forment des liaisons hydrogène de protons imino. Nous retrouvons donc des liaisons d'appariement G-C et T-G majoritairement, et quelques T-A (peu de PNA étudiés par RMN possèdent une Adénine au moins).

L'étude des corrélations obtenues à l'aide de séquences telles les NOESYjr ou TOCSY n'ont pas apporté l'aide escomptée. Néanmoins, nous retrouvons des corrélations sur les acides nucléiques entre un proton imino engagé dans un appariement et un proton de cette même base. Aucune corrélation inter-base n'est vue. Il est donc difficile dans ces conditions de déterminer une structure spatiale pour les PNA (hélice par exemple). L'expérience de corrélation hétéronucléaire, HSQC, a aidé pour l'attribution de certaines bases nucléiques. La quantité d'échantillon faisant défaut, il n'est pas possible pour nous d'aller plus loin et d'observer tout les signaux attendus. Il est impensable d'enregistrer des séquences 1D ^{13}C classiques sur de si faibles concentrations d'échantillon.

Cependant, les expériences de variation de température sur les protons imino des PNA sont concluantes. La perte de signal relatif à un proton imino, d'un appariement Wobble entre une base nucléique T et une base nucléique G, avec l'élévation de la température est constatée plusieurs fois. En comparant les PNA 3 et 4 lors de la variation de température suivie par RMN, une différence notable est identifiée. Pour rappel, ces PNA possèdent les mêmes bases nucléiques sur le squelette, la seule différence réside en la présence de γ -pseudo sérines sur le PNA 4. Il est observé que les imino des appariements Wobble, T-G, ont un comportement différent. Le PNA 4 présente une stabilité plus grande selon le signal imino T-G. Le signal RMN ne disparaît pas avec la hausse de température à l'instar du signal du PNA 3 sans γ -pseudo sérine. L'introduction d'une γ -pseudo sérine sur le squelette peptidique crée une stabilité structurale plus importante pour le PNA. Le même phénomène est observé sur les duplexes 11 et 12 et pour le triplex 13, puisque leurs signaux imino sont toujours présents à haute température. Ils ont même tendance à être plus marqués en RMN, et mieux définis. Ces complexes possèdent alors une grande stabilité thermique.

Avec l'aide du DINAMelt Web Server, nous mettons en évidence les différents complexes pouvant être formés par les PNA en solution. La présence d'homodimères ou d'hairpin est discutée selon les PNA. Ce serveur autorise par ailleurs la détec-

mination des températures de fusion de ces complexes. Cet outil est plus qu'utile pour la préparation des échantillons. Il permet de déterminer le cycle de "recuit" que doit subir l'échantillon avant analyse. Il aide ainsi à éviter les mésappariements et à favoriser la formation de duplexes stables et complets (dans le cas des duplexes et du triplexe). Cet outil est utilisé pour les PNA par analogie avec l'ARN du fait de la présence de liaisons Wobble visibles par RMN.

Les mesures de dichroïsme circulaire et d'absorbance sont beaucoup plus concluantes que les analyses par RMN. Ces dernières ont mis en évidence une structure chirale présente à 35°C pour les PNA 4, 5, 6, et 10. Structure qui n'existe plus à haute température (90°C) comme le montrent les courbes d'ellipticité en fonction de la longueur d'onde pour ces quatre PNA. Une "hélice chirale" se forme donc à température ambiante et la dénaturation intervient avant 90°C. Ces structures sont complètement réversibles, puisque les courbes relevées à 35°C avant et après dénaturation sont strictement identiques.

Nous avons mis en évidence des similitudes entre les PNA et l'ARN par leur comportement et leur capacité à former des homoduplexes. Par contre, nous avons démontré que les PNA sont plus stables en solution. Les températures de fusion des PNA sont très élevées (supérieures à 80°C dans la majorité des cas) selon la comparaison entre les T_m théoriques et expérimentaux. Elles témoignent que les homodimères, hairpin et autres duplexes formés sont très stables. Cette stabilité provient majoritairement du squelette peptidique, à l'instar des sucres diphosphate de l'ARN ou de l'ADN. L'insertion de la γ -pseudo sérine joue aussi un rôle important en augmentant encore la stabilité des complexes formés.

Par ailleurs les PNA avec deux acides glutamiques en bout de chaîne ont fourni de bien meilleurs résultats dans leur globalité. Les spectres RMN sont plus propres, les mesures de dichroïsme circulaire des PNA chiraux sont plus concluantes et les spectres de mesure d'absorbance plus jolis également. Afin de déterminer l'influence de cet acide aminé en bout de chaîne d'autres analyses seraient à réaliser. L'analyse par RMN du PNA 5 portant deux acides glutamiques serait nécessaire afin de la comparer au PNA 7 portant deux lysine. La structure secondaire des PNA mérite d'être déterminée en poursuivant cette étude et en la complétant par de nouvelles mesures biophysiques.

Bibliographie

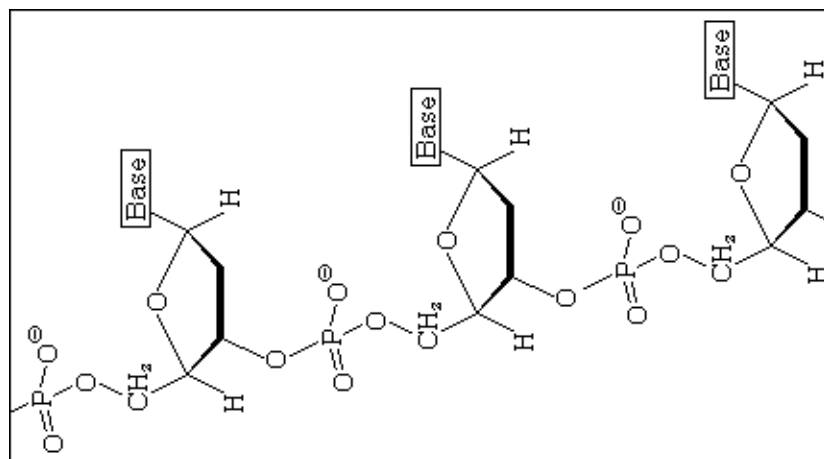
- [Achim 2007] Achim C., Armitage B.A., Ly D.H. et Schneider J.W. *Peptide Nucleic Acids (PNAs)*. John Wiley & Sons, Inc., 2007. (Cité en page 36.)
- [Armitage 2003] Armitage B.A. *The impact of nucleic acid secondary structure on PNA hybridization*. *Drug Discovery Today*, vol. 8, no. No. 5, 2003. (Cité en page 37.)
- [Brown 1994] Brown S.C., Thomson S.A., Veal J.M. et Davis D.G. *NMR solution structure of a peptide nucleic acid complexed with RNA*. *Science*, vol. 265, no. 5173, 1994. (Cité en page 45.)
- [Chouikhi 2010] Chouikhi D., Barluenga S. et Winssinger N. *Clickable peptide nucleic acids (cPNA) with tunable affinity*. *Chem. Commun.*, vol. 46, no. 30, page 5476, 2010. (Cité en page 36.)
- [Demidov 2001] Demidov V.V. *PD-loop technology : PNA openers at work*. *Expert Rev. Mol. Diagn.*, vol. 1, no. 3, 2001. (Cité en page 36.)
- [Demidov 2004] Demidov V.V. et Frank-Kamenetskii M.D. *Two sides of the coin : affinity and specificity of nucleic acid interactions*. *Trends Biochem Sci*, vol. 29, no. 2, 2004. (Cité en page 36.)
- [Dragulescu-Andrasi 2006] Dragulescu-Andrasi A., Rapireddy S., Frezza B.M., Gayathri C., Gil R.R. et Ly D.H. *A Simple γ -Backbone Modification Preorganizes Peptide Nucleic Acid into a Helical Structure*. *J Am Chem Soc*, vol. 128, no. 31, 2006. (Cité en page 38.)
- [Faccini 2008] Faccini A., Tortori A., Tedeschi T., Sforza S., Tonelli R., Pession A., Corradini R. et Marchelli R. *Circular dichroism study of DNA binding by a potential anticancer peptide nucleic acid targeted against the MYCN oncogene*. *Chirality*, vol. 20, no. 3-4, pages 494–500, 2008. (Cité en pages 37 et 78.)
- [He 2008] He W., Hatcher E., Balaeff A., Beratan D.N., Gil R.R., Madrid M. et Achim C. *Solution Structure of a Peptide Nucleic Acid Duplex from NMR Data : Features and Limitations*. *J Am Chem Soc*, vol. 130, no. 40, 2008. (Cité en page 45.)
- [He 2010] He W., Crawford M.J., Rapireddy S., Madrid M., Gil R.R., Ly D.H. et Achim C. *The structure of a γ -modified peptide nucleic acid duplex*. *Mol. BioSyst.*, vol. 6, no. 9, page 1619, 2010. (Cité en page 39.)
- [Huang 2004] Huang Y., Dey S., Zhang X., S nnichsen F. et Garner P. *The α -Helical Peptide Nucleic Acid Concept : Merger of Peptide Secondary Structure and Codified Nucleic Acid Recognition*. *J Am Chem Soc*, vol. 126, no. 14, 2004. (Cité en page 78.)
- [Kazane 2013] Kazane S.A., Axup J.Y., Kim C.H., Ciobanu M., Wold E.D., Barluenga S., Hutchins B.A., Schultz P.G., Winssinger N. et Smider V.V. *Self-Assembled Antibody Multimers through Peptide Nucleic Acid Conjugation*. *J Am Chem Soc*, vol. 135, no. 1, 2013. (Cité en page 36.)

- [Koh] Koh W. *Peptide nucleic acid (PNA) : and its Applications*. Panagene Inc. (Cité en page 38.)
- [Kuhn 2001] Kuhn H., Demidov V.V., Gildea B.D., Fiandaca M.J., Coull J.C. et Frank-Kamenetskii M.D. *PNA beacons for duplex DNA*. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.*, vol. 11, no. 4, 2001. (Cité en page 36.)
- [Magar 1971] Magar M.E. *On the possibility of determining the secondary structure of proteins in solution*. *J Theor Biol*, vol. 33, no. 1, pages 105–119, 1971. (Cité en page 78.)
- [Nielsen 1991] Nielsen P.E., Egholm M., Berg R.H. et Buchardt O. *Sequence-Selective Recognition of DNA by Strand Displacement with a Thymine-Substituted Polyamide*. *Science*, vol. 254, 1991. (Cité en page 35.)
- [Nielsen 1999a] Nielsen P.E. *Peptide nucleic acids as therapeutic agents*. *Curr Opin Struc Biol*, vol. 9, pages 353–357, 1999. (Cité en page 36.)
- [Nielsen 1999b] Nielsen P.E. et Egholm M. *An Introduction to Peptide Nucleic Acid*. *Current Issues Molec. Biol*, vol. 1, no. 2, 1999. (Cité en page 36.)
- [Plateau 1982] Plateau P. et Guéron M. *Exchangeable Proton NMR without Baseline Distortion, Using New Strong-Pulse Sequences*. *J Am Chem Soc*, 1982. (Cité en page 46.)
- [Saxena 1971] Saxena V.P. et Wetlaufer D.B. *A new basis for interpreting the circular dichroic spectra of proteins*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, vol. 68, no. 5, 1971. (Cité en page 78.)
- [Stender 2003] Stender H. *PNA FISH : an intelligent stain for rapid diagnosis of infectious diseases*. *Expert Rev. Mol. Diagn.*, vol. 3, no. 5, 2003. (Cité en page 36.)
- [Uhlmann 1998] Uhlmann E., Peyman A., Breipohl G. et Will D.W. *PNA : Synthetic Polyamide Nucleic Acids with Unusual Binding Properties*. *Angew. Chem. Int. Ed*, vol. 37, 1998. (Cité en page 36.)
- [Winssinger 2012] Winssinger N. *DNA display of PNA-tagged ligands : a versatile strategy to screen libraries and control geometry of multidentate ligands*. *Artificial DNA : PNA & XNA*, vol. 3, no. 3, 2012. (Cité en page 36.)

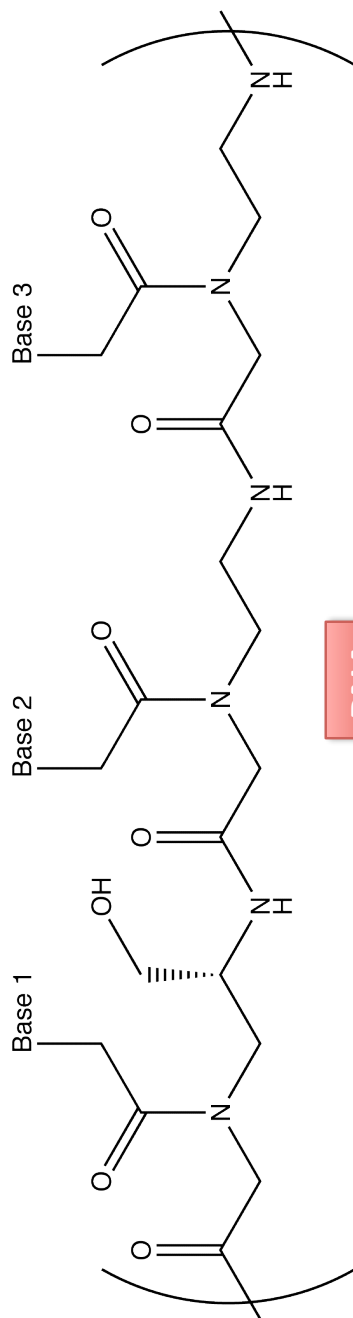
Annexes

ANNEXE C

Principe et description des PNA



ADN



PNA

Synthétisés par Nicolas Winssinger et son équipe
(ISIS, Strasbourg)

FIGURE C.1 – Structure de base d'un PNA par comparaison à un brin d'ADN.

ANNEXE D

Stratégies thérapeutiques liées à l'utilisation des PNA

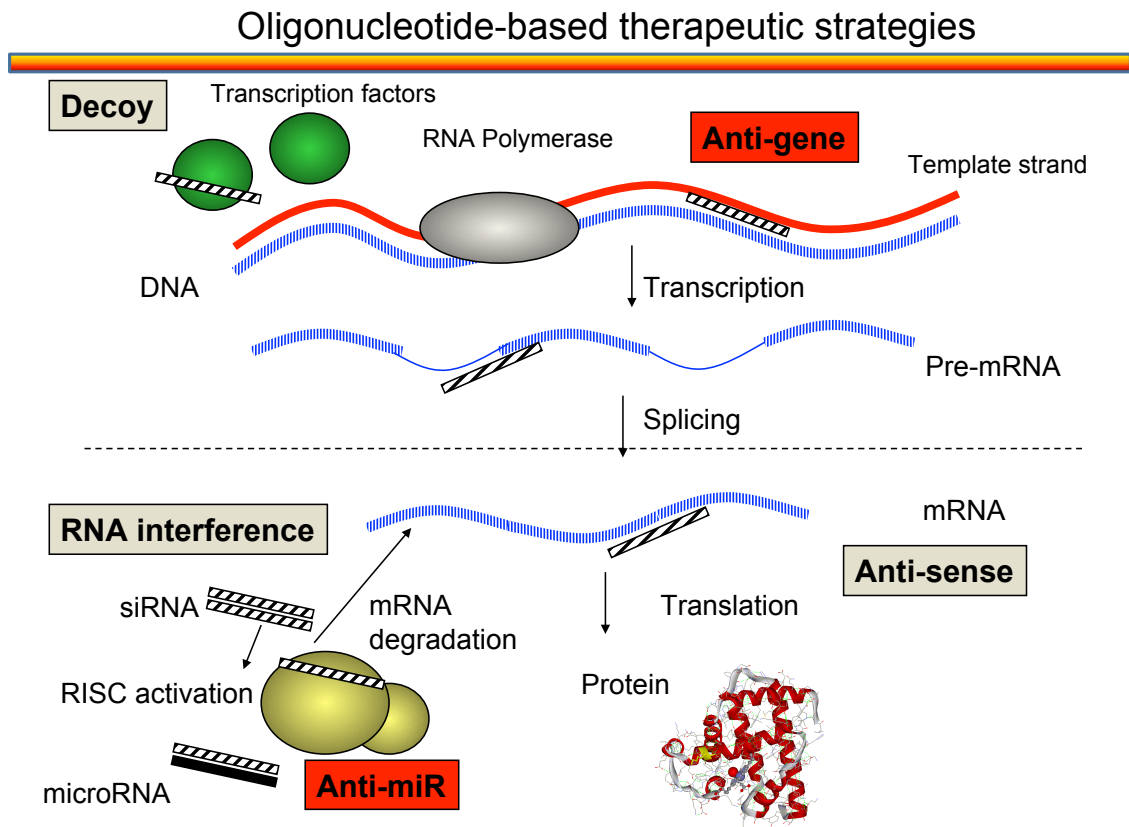


FIGURE D.1 – Stratégie thérapeutique utilisant des analogues d’oligonucléotides tels que les PNA. Reproduction sous autorisation de *Roberto Corradini*, selon une présentation intitulée *Multi-functionnal PNA for sensing and drug development* donnée à l’ISIS le 11 juin 2013.

ANNEXE E

Formules chimiques semi-développées des PNA

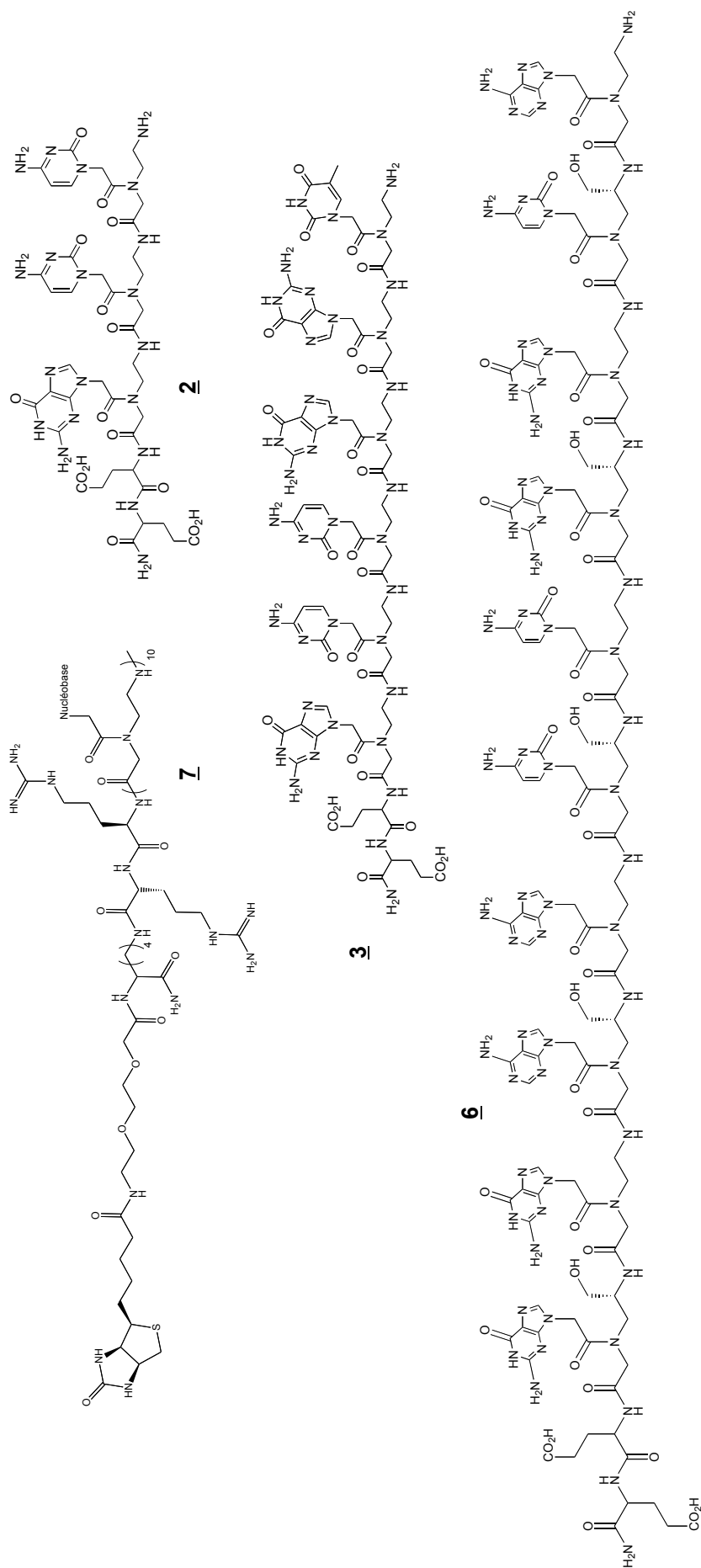


FIGURE E.1 – Exemples de formules semi-développées de PNA linéaires ou ramifiées, molécules 2, 3, 6 et 7.

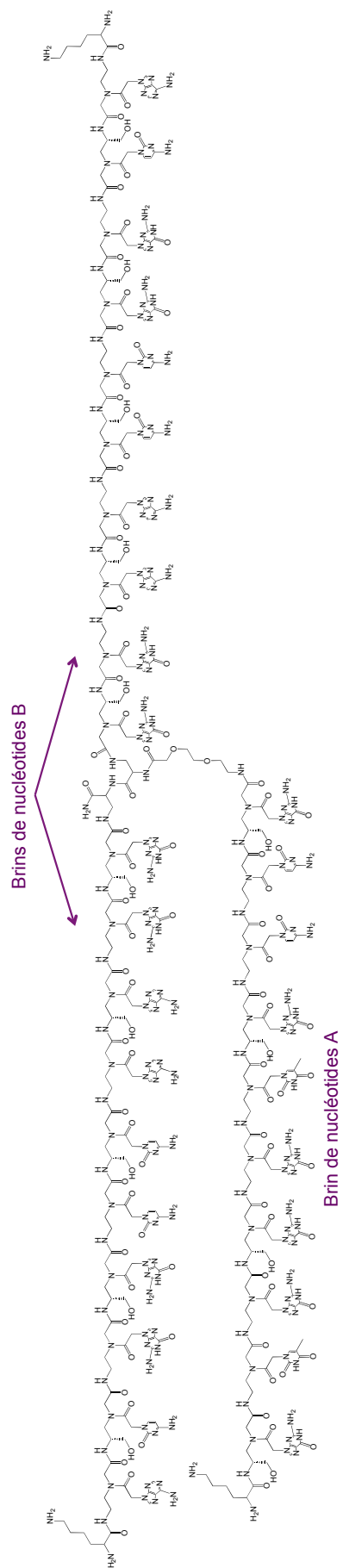


FIGURE E.2 – Exemple de formule semi-développée du PNA ramifié 8.

ANNEXE F

Le DINAMelt Web Server

FIGURE F.1 – Page d'accueil du DINAMelt Web Server, <http://mfold.rna.albany.edu/>

FIGURE F.2 – Onglet pour l'hybridation de deux différents brins. Cette page nous donne une information sur la température de fusion du dimère considéré.

The screenshot displays the web interface for 'The DINAMelt Web Server'. At the top left is the logo for 'THE RNA INSTITUTE COLLEGE OF ARTS AND SCIENCES UNIVERSITY AT ALBANY State University of New York'. The main title is 'The DINAMelt Web Server'. A search bar is located in the top right corner. Below the title is a navigation bar with links for 'Home', 'DINAMelt Web Server', 'Mfold Web Server', and 'Forum'. The main content area is titled 'Two-state melting (hybridization)'. It includes a form for entering a job name, a text box for sequences, and a note about submitting multiple sequences. Parameters for energy rules and strand concentration are also visible.

THE RNA INSTITUTE
COLLEGE OF ARTS AND SCIENCES
UNIVERSITY AT ALBANY State University of New York

The DINAMelt Web Server

SEARCH

Home DINAMelt Web Server Mfold Web Server Forum

Applications

- [Homodimer Simulations](#)
- [Hybridization of two different strands](#)
- [Quickfold](#)
- [Two State melting \(hybridization\)](#)
- [Two-state Folding](#)
- [Zipfold](#)

Software

- [Ensemble Calc](#)
- [OligoAnalyzeAux](#)
- [UNAFold](#)

Information

- [DINAMelt References](#)
- [UNAFold Man Pages](#)

About

- [About](#)

Contact

- [Contact](#)

Two-state melting (hybridization)

Enter a name for your job:

Sequences: Enter your sequences in 5' to 3' order, separated by semicolons if you have more than one duplex. The first sequence in the first box will be hybridized with the first in the second box, the second with the second, and so on.

Note: if you have many sequences to hybridize with the same parameters, please submit them all as one job, rather than submitting a separate job for each sequence.

Energy rules: at °C, [Na⁺] = , [Mg⁺⁺] = , Polymer mode

Strand concentration:

FIGURE F.3 – Onglet de simulation d’homomérisation d’un PNA sur lui même. Ceci offre un résultat schématique de l’appariement des acides nucléiques entre eux.

ANNEXE G

Spectres RMN des PNA

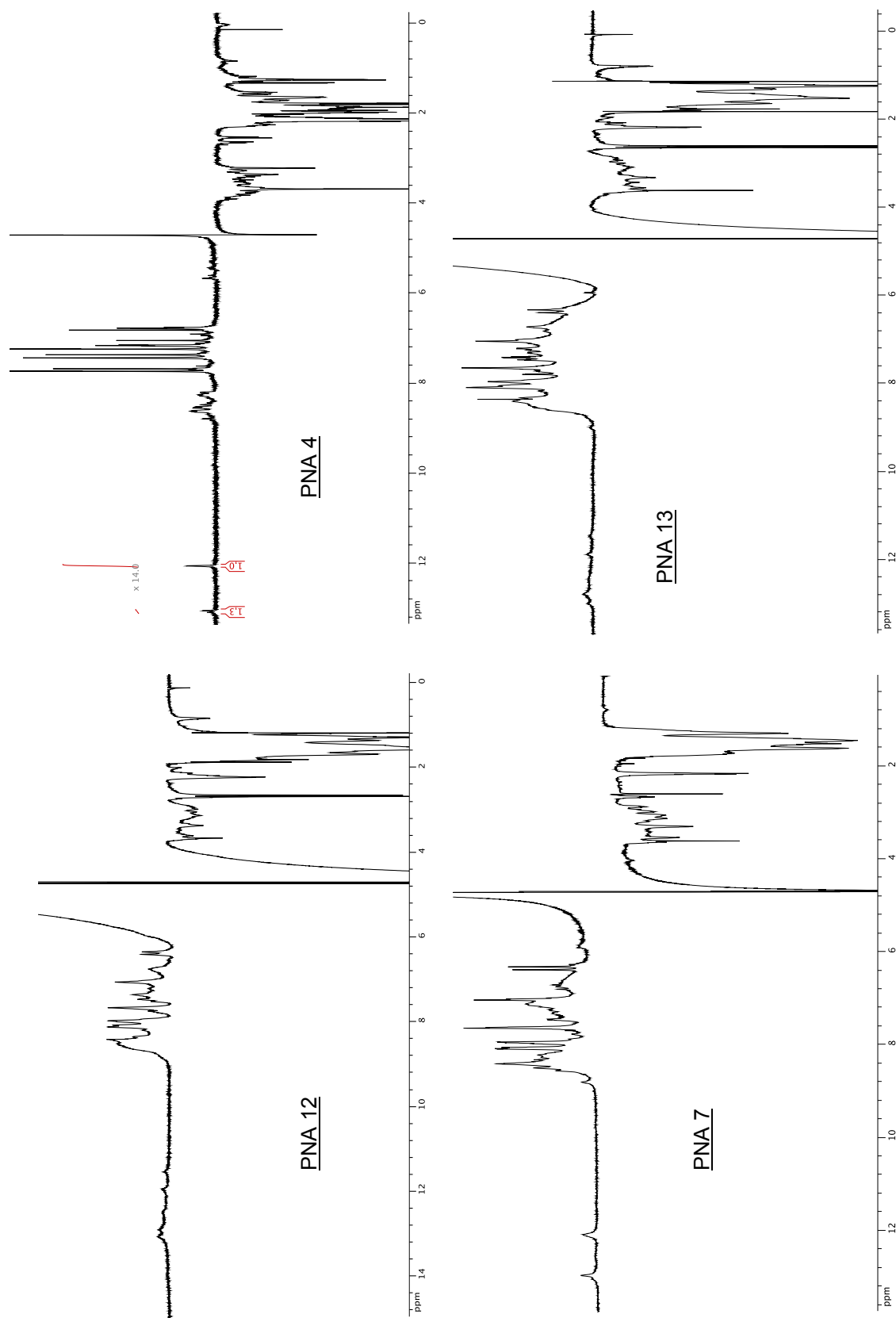


FIGURE G.1 – Spectres RMN $1\text{D}^1\text{H}$ Jump & Return des PNA 4, 7, 12 et 13 réalisés à 700 MHz. PNA 12 : $[\text{12}] = 200 \mu\text{M}$, $[\text{Phosphate}] = 25 \text{ mM}$, $T = 303\text{K}$. PNA 4 : $[\text{4}] = 1,1 \text{ mM}$, $[\text{Phosphate}] = 25 \text{ mM}$, $T = 298\text{K}$. PNA 7 : $[\text{7}] = 1,71 \text{ mM}$, $[\text{Phosphate}] = 15 \text{ mM}$, $T = 298\text{K}$. PNA 13 : $[\text{13}] = 100 \mu\text{M}$, $[\text{Phosphate}] = 25 \text{ mM}$, $T = 313\text{K}$.

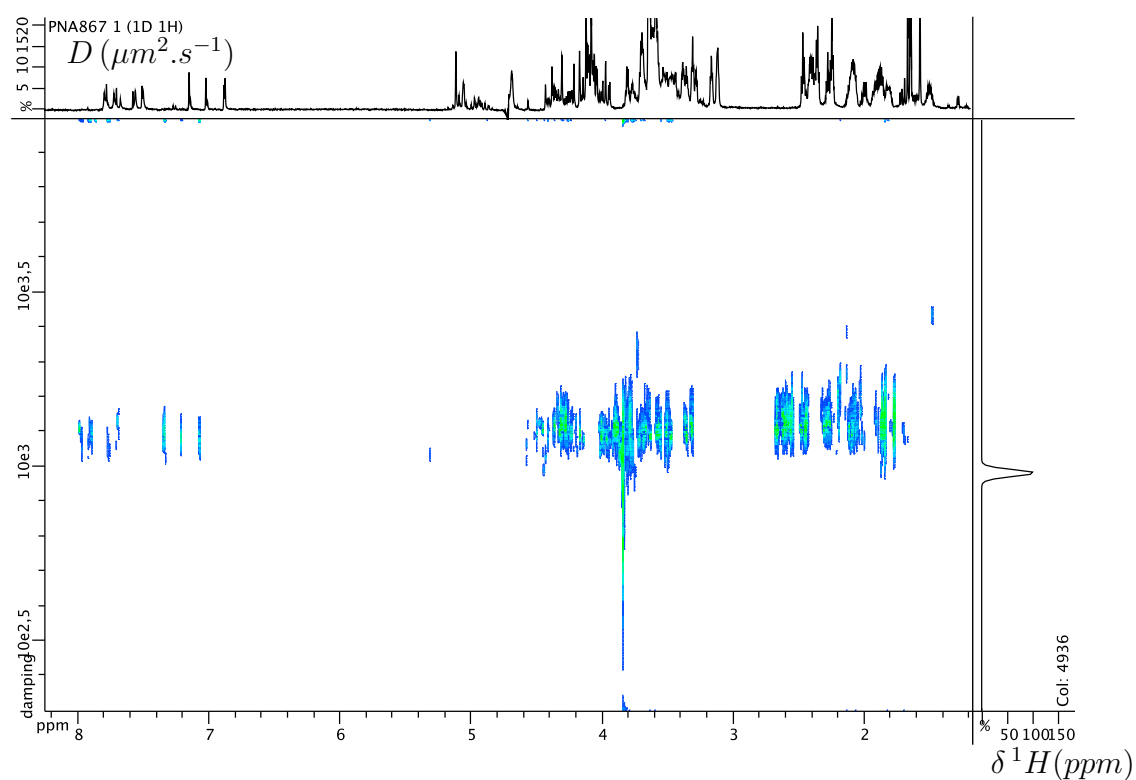


FIGURE G.2 – Spectre 2D DOSY du PNA 1 réalisé à 700 MHz. NS=48, $[1]=1,56$ mM, [Phosphate]=25 mM, T=298K, temps d'expérience : 75min.

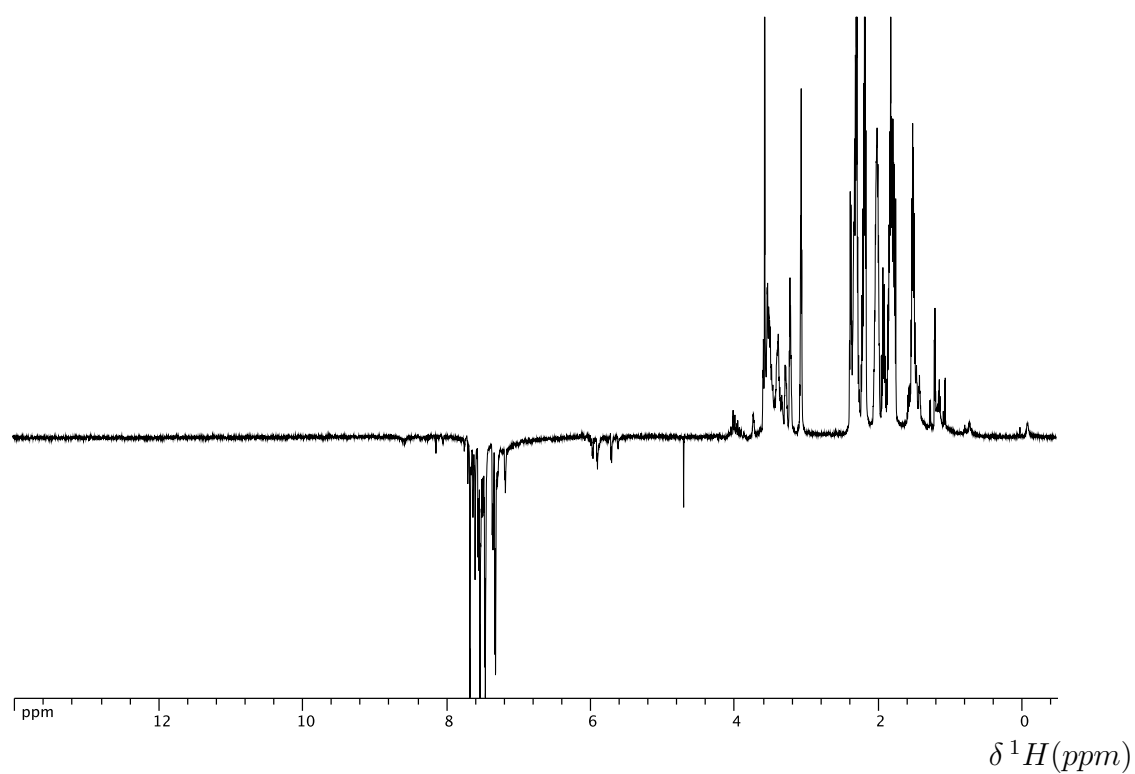


FIGURE G.3 – Spectre 1D ^1H , Jump & Return du PNA 2 réalisé à 700 MHz. NS=128, [2]=2,12 mM, [Phosphate]=25 mM, T=293K.

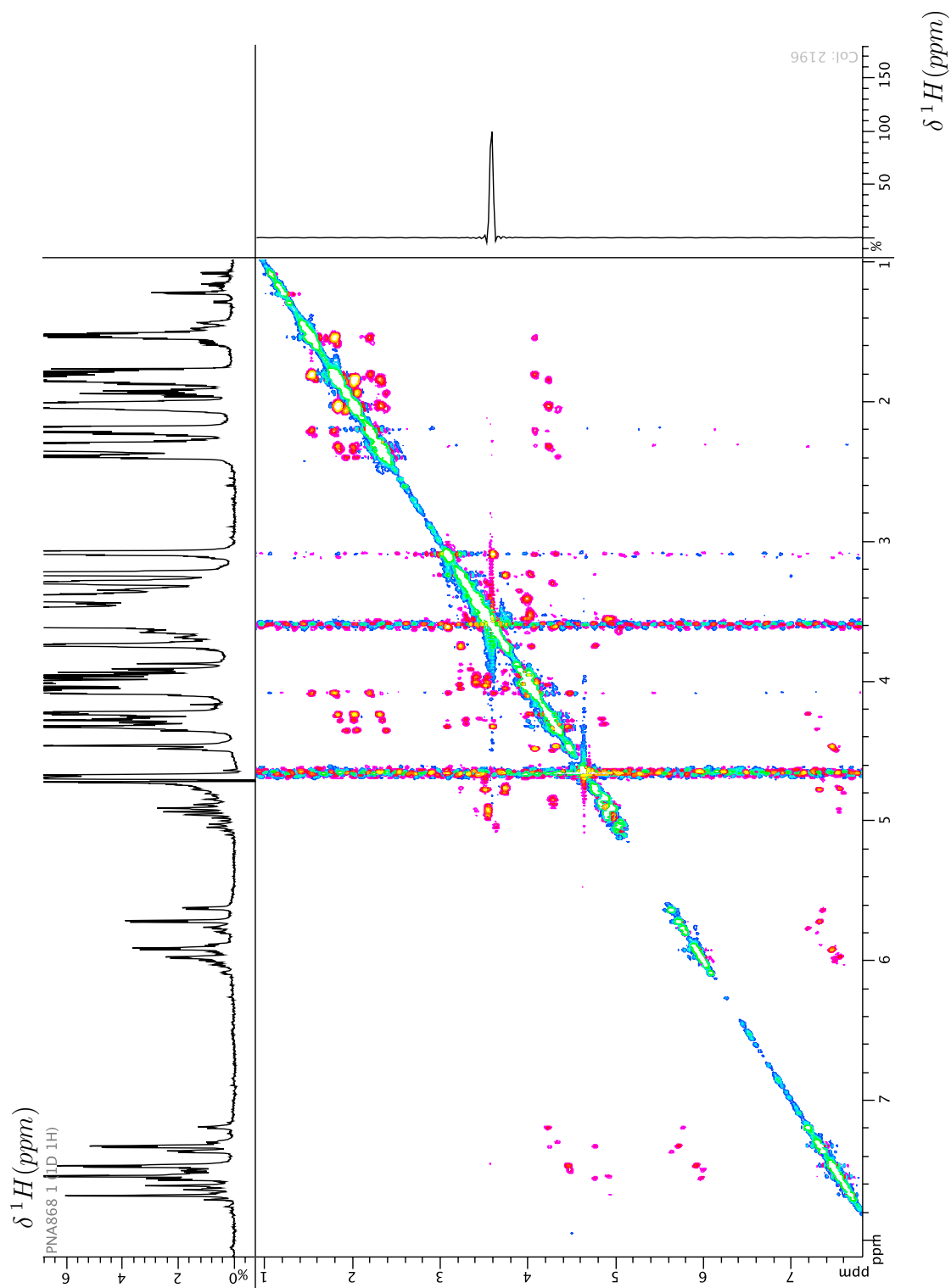


FIGURE G.4 – Spectre 2D ^1H - ^1H , ROESY du PNA 2 réalisé à 700 MHz. NS=24, temps de mélange=250 msec, $[\underline{2}]=2,12$ mM, [Phosphate]=25 mM, $T=293\text{K}$.

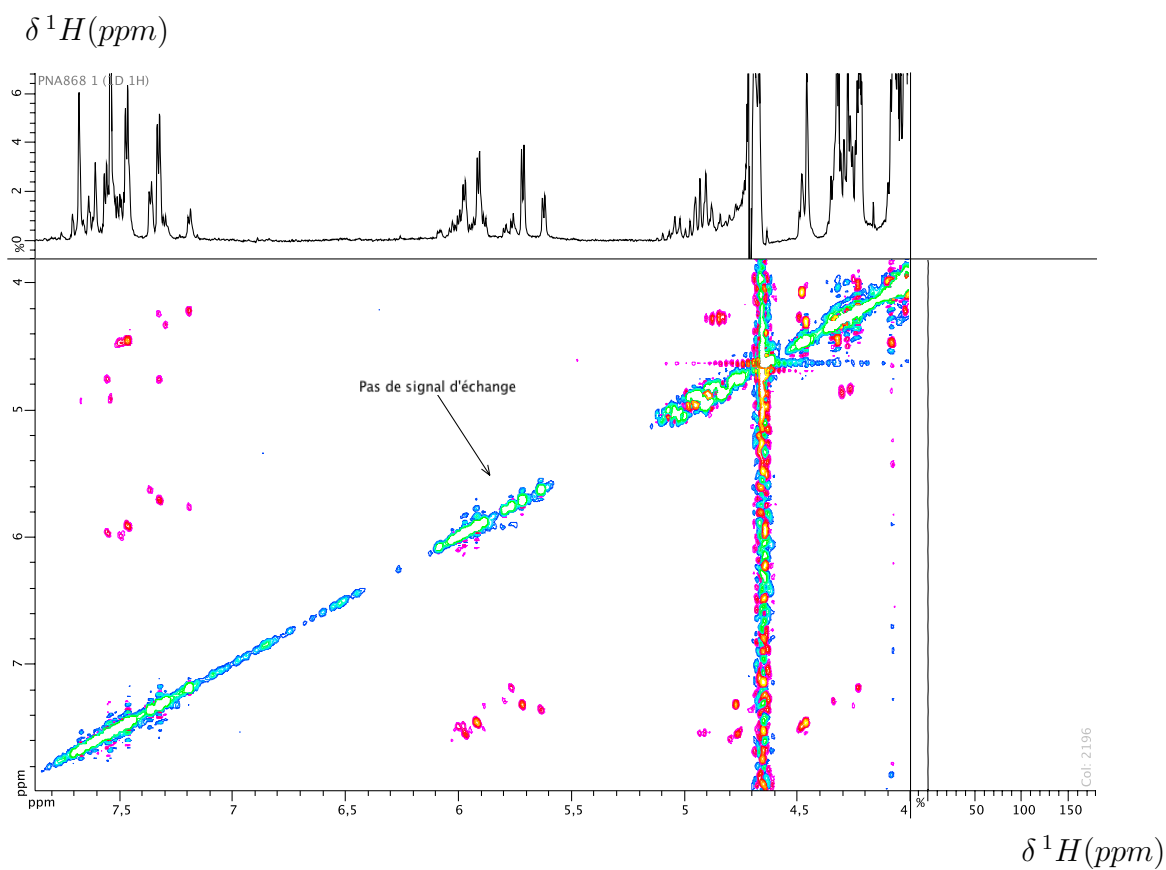


FIGURE G.5 – Agrandissement du spectre 2D 1H - 1H , ROESY du PNA 2 réalisé à 700 MHz. NS=24, temps de mélange=250 msec, $[2]=2,12$ mM, [Phosphate]=25 mM, T=293K.

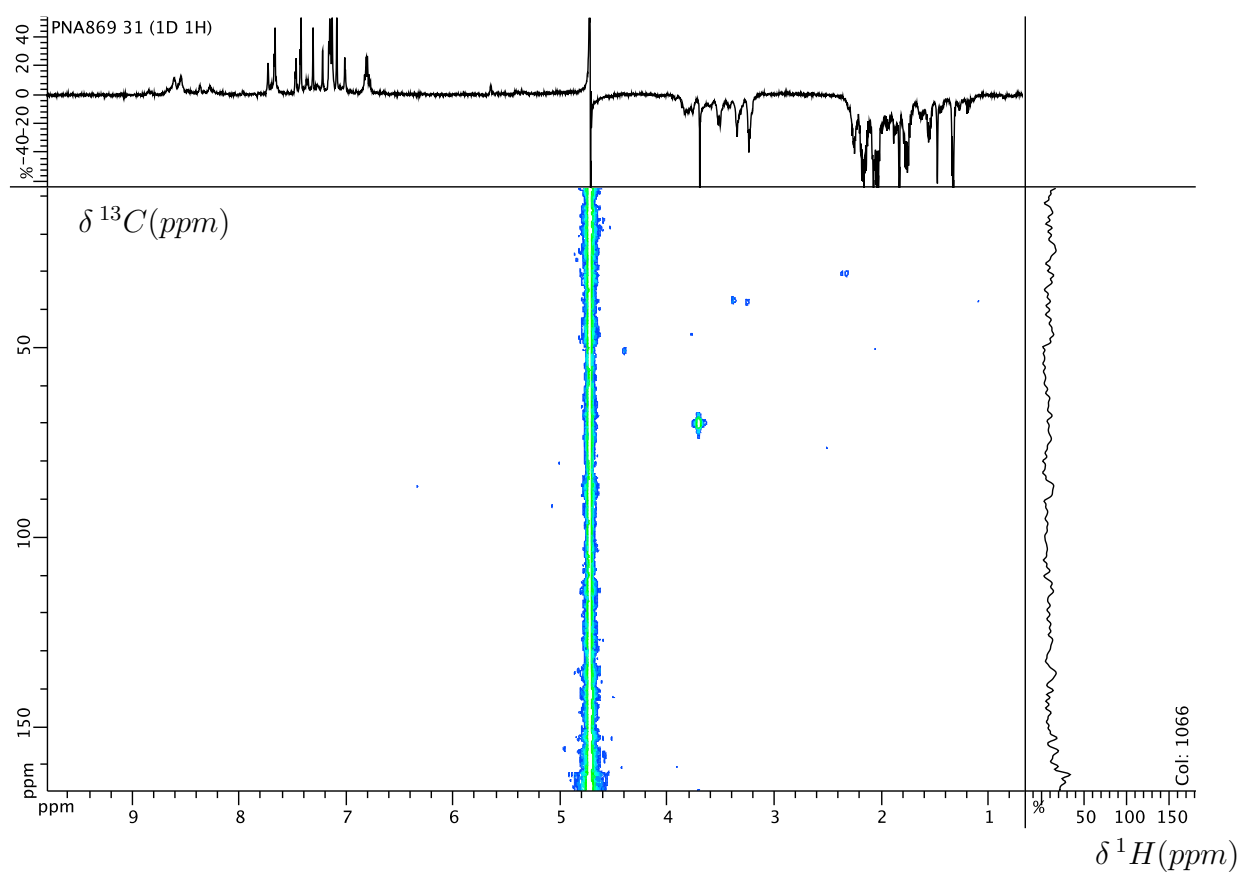


FIGURE G.6 – Spectre 2D ^1H - ^{13}C , HSQC du PNA 3 réalisé à 700 MHz. NS=320
[3]=80 μM , [Phosphate]=25 mM, T=303K, temps d'acquisition : 1 jour 19h.

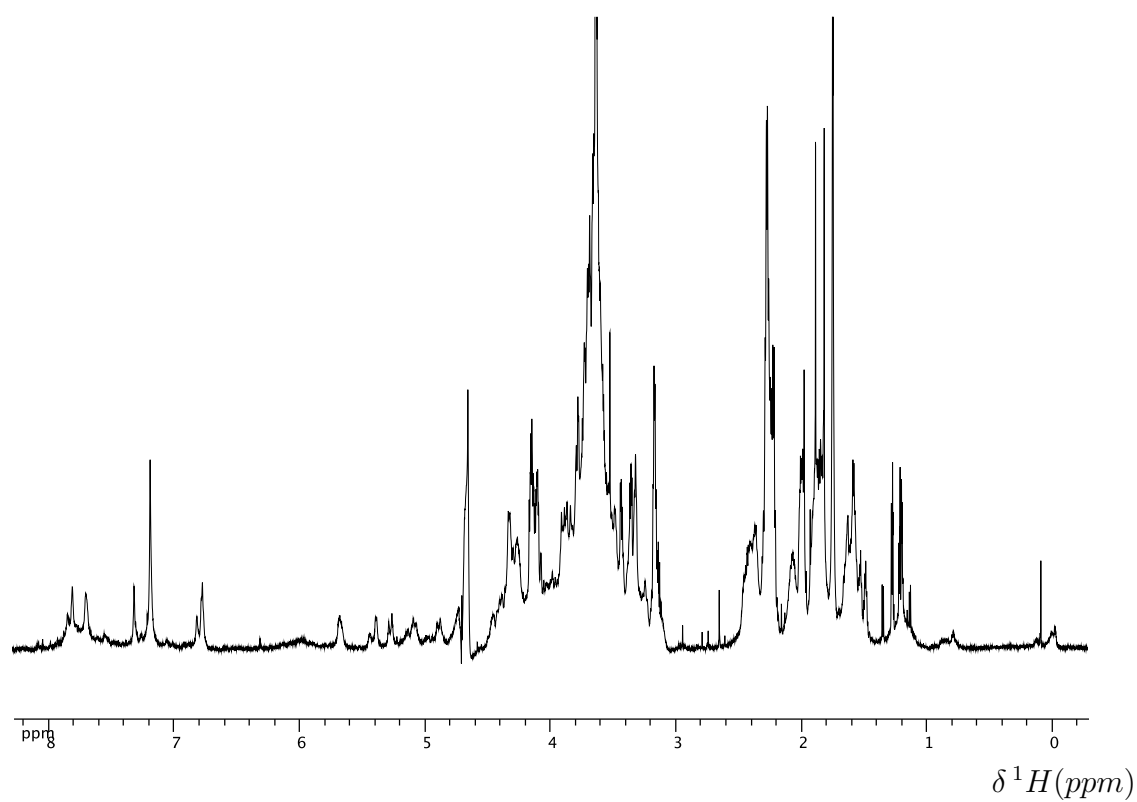


FIGURE G.7 – Spectre 1D ^1H zqpr du PNA 4 réalisé à 700 MHz. NS=128, [4]=1,1 mM, [Phosphate]=0 mM, pH=3, T=298K.

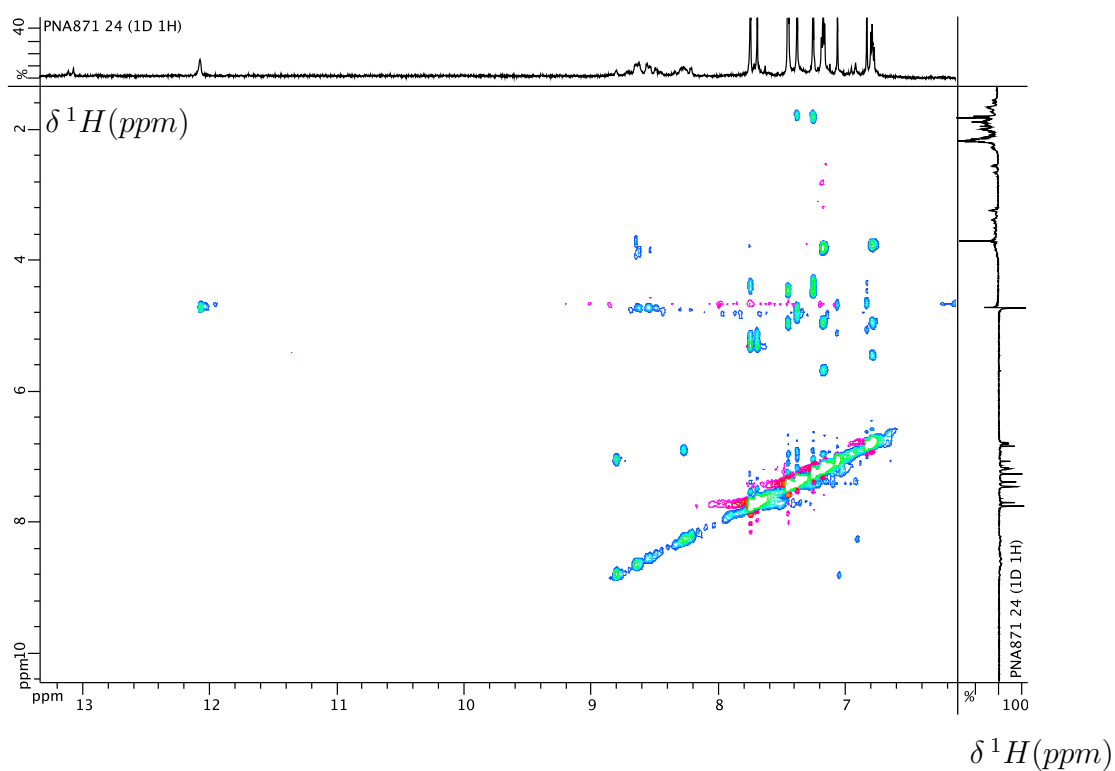


FIGURE G.8 – Spectre 2D ^1H - ^1H , NOESY du PNA 4 réalisé à 700 MHz. NS=256, temps de mélange=250 msec, $[\underline{4}]$ =1,1 mM, [Phosphate]=25 mM, T=303K, temps d'acquisition : 1 jour 1h et 36minutes. Agrandissement de la région où les taches de corrélations sont visibles.

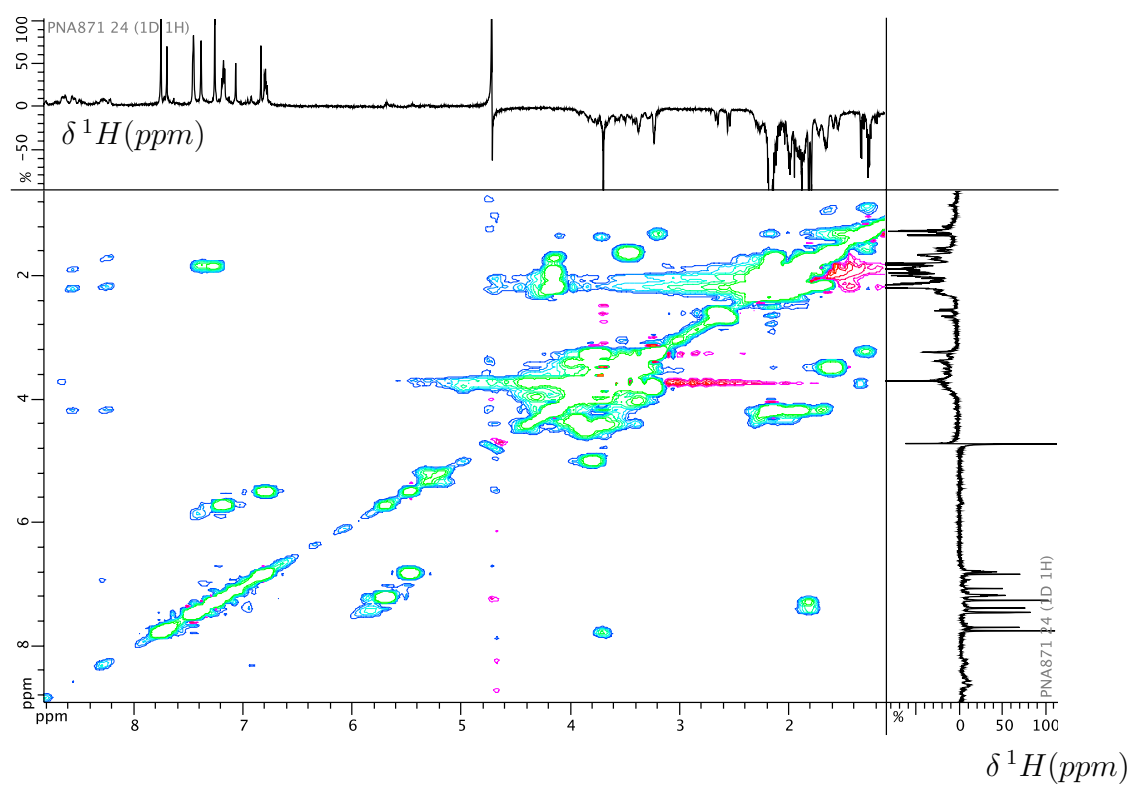


FIGURE G.9 – Spectre 2D ^1H - ^1H , TOCSY du PNA 4 réalisé à 700 MHz. NS=164, temps de mélange=90 msec, $[\underline{4}]$ =1,1 mM, [Phosphate]=25 mM, T=303K, temps d'acquisition : 19 heures. Agrandissement de la région où les taches de corrélations sont visibles.

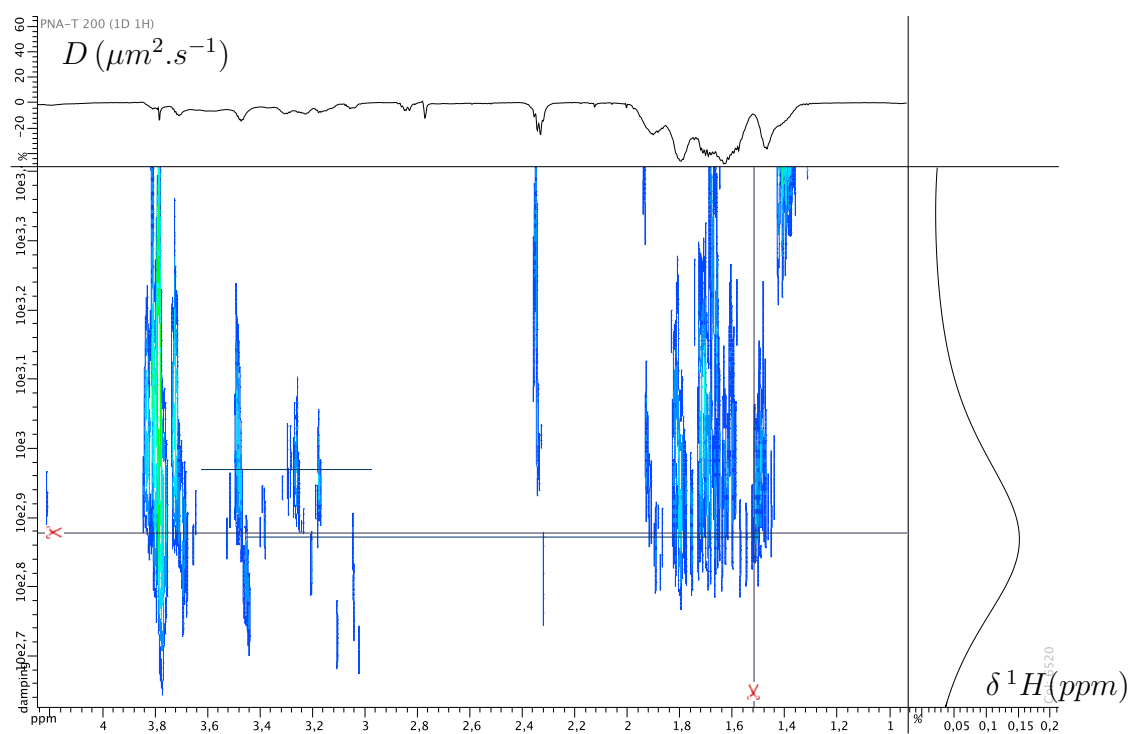


FIGURE G.10 – Spectre DOSY du PNA 11 réalisé à 700 MHz. $[\underline{11}] = 200 \mu\text{M}$, $[\text{Phosphate}] = 10 \text{mM}$, $T = 313\text{K}$.

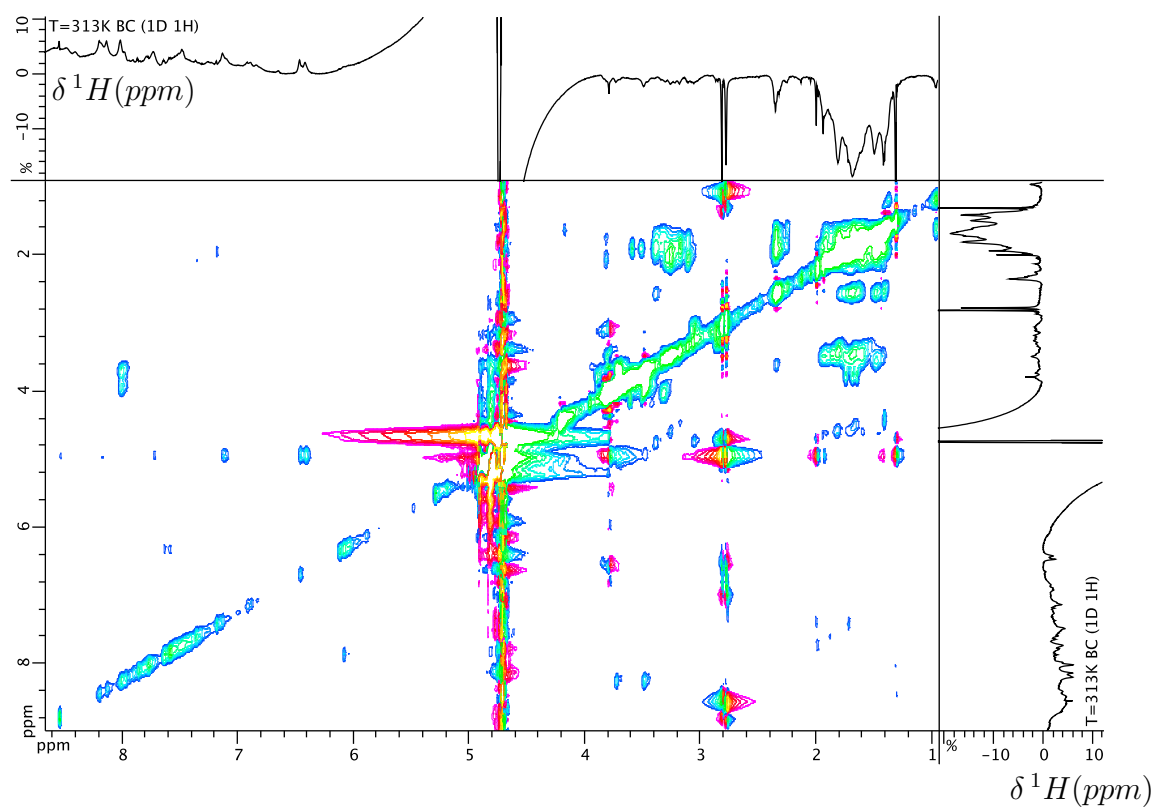


FIGURE G.11 – Spectre 2D ^1H - ^1H , TOCSY du PNA 12 réalisé à 700 MHz. NS=320, temps de mélange=120 msec, $[12]=200\ \mu\text{M}$, [Phosphate]=10 mM, T=313K.

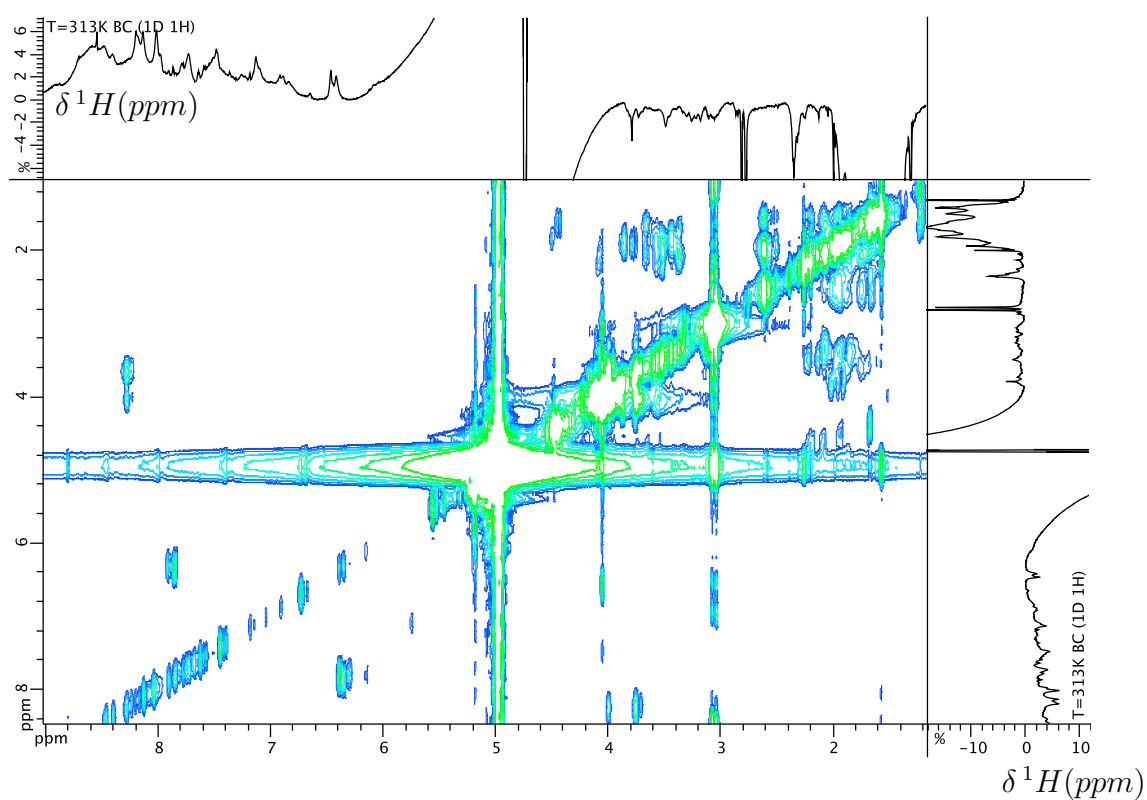


FIGURE G.12 – Spectre 2D ^1H - ^1H , TOCSY du PNA 12 réalisé à 700 MHz. NS=320, temps de mélange=50 msec, [12]=200 μM , [Phosphate]=10 mM, T=313K.

ANNEXE H

Dichroïsme Circulaire et Mesures d'absorbance des PNA

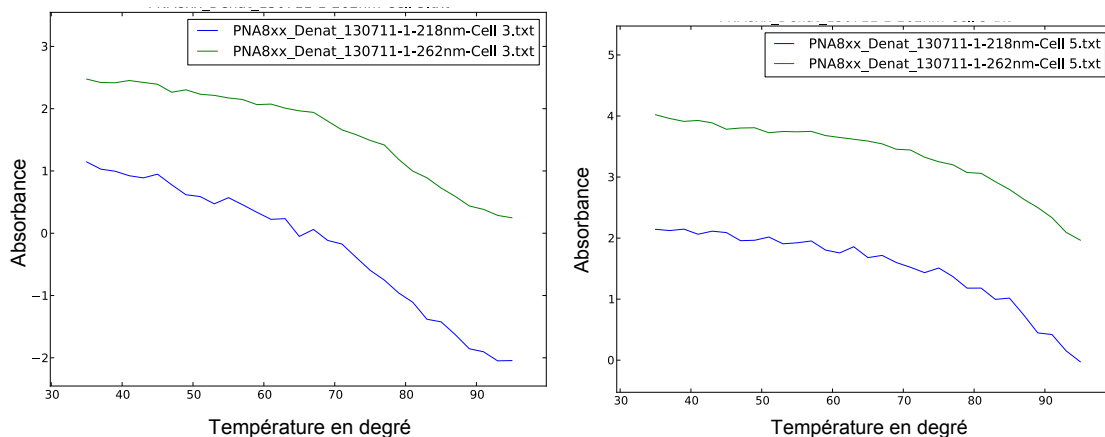


FIGURE H.1 – Gauche : Courbe de réponse du signal dichroïque du PNA 5 en fonction de la température Droite : Courbe de réponse du signal dichroïque du PNA 10 en fonction de la température. Mesures à 218 nm en bleu et 262 nm en vert.

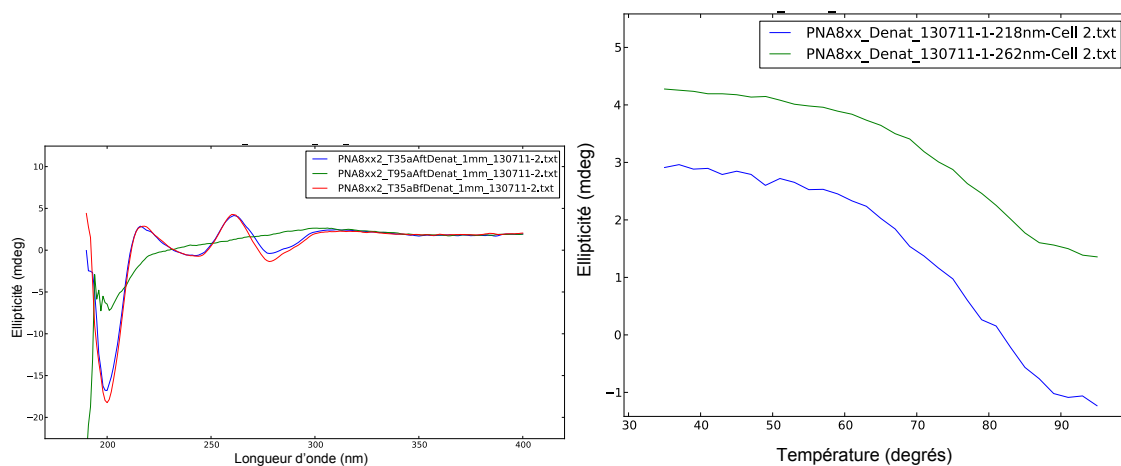


FIGURE H.2 – Gauche : Courbe de réponse du signal dichroïque du PNA 4 en fonction de la longueur d'onde à 35°C en bleu avant dénaturation, à 95°C en vert et de nouveau à 35°C en rouge après dénaturation. Droite : Courbe de réponse du signal dichroïque du PNA 4 en fonction de la température. Mesure à 218 nm en bleu et 262 nm en vert.

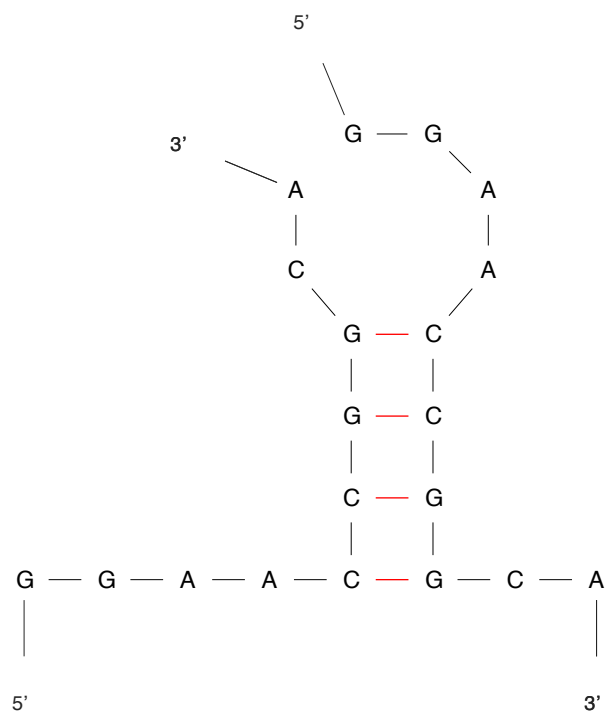


FIGURE H.3 – Représentation issue du DINAMelt Web Server pour l'homodimérisation du PNA 6 en solution.

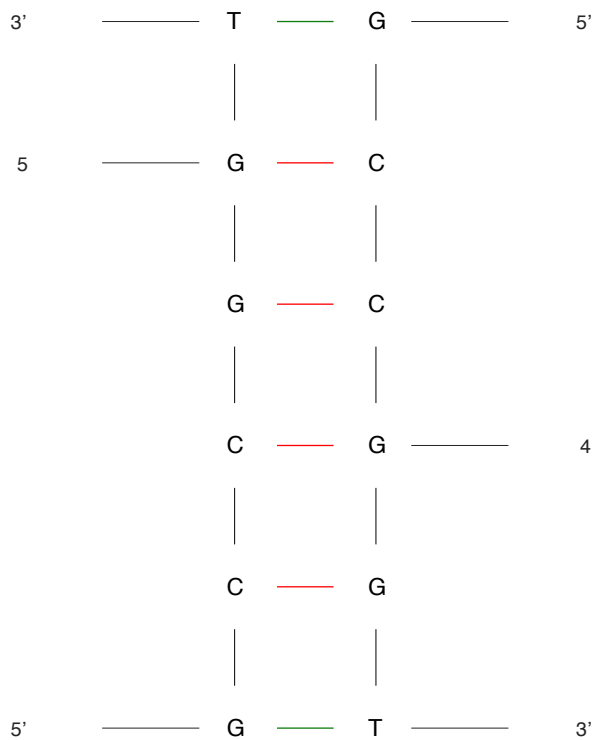


FIGURE H.4 – Représentation issue du DINAMelt Web Server pour l'homodimérisation du PNA 4 en solution.

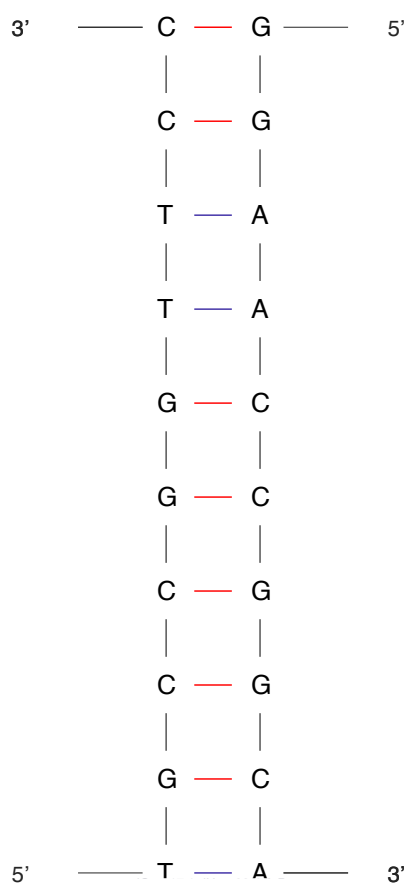


FIGURE H.5 – Représentation issue du DINAMelt Web Server pour l’homodimérisation du PNA 10 en solution.

Utilisation de la technologie HR-MAS pour les mesures d'interaction protéine-ligand

Sommaire

IV.1 Introduction et Principe de la technologie RMN HR-MAS	117
IV.1.1 Théorie de la RMN HR-MAS	118
IV.1.2 Le couplage dipolaire	119
IV.1.3 Généralisation du couplage dipolaire et tenseur de rang 2 . .	120
IV.1.4 Susceptibilité magnétique	120
IV.1.5 Angle magique et rotation	121
IV.1.6 La Haute Résolution	121
IV.1.7 Applications de la HR-MAS	122
IV.2 Système biologique utilisé pour l'étude	123
IV.2.1 Protéine PDZ2/6	124
IV.2.2 Préparation des échantillons, expressions, purifications	125
IV.2.3 Préparation des peptides utilisés pour les interactions	126
IV.2.4 Protéine HSP90	128
IV.3 Analyses HR-MAS de protéines	129
IV.3.1 Expériences HR-MAS en phase liquide	129
IV.3.2 Méthyl-SOFAST-HMQC	130
IV.3.3 Expériences HR-MAS en phase greffée	134
IV.3.4 Comparaison 400 MHz - 800 MHz	139
IV.4 Publication dans J. Pharm. Biomed. Anal.	142
IV.5 Conclusion	149
Bibliographie	151

IV.1 Introduction et Principe de la technologie RMN HR-MAS

La RMN HR-MAS (High Resolution Magic Angle Spinning) est une technique intermédiaire entre la RMN du liquide classique et la RMN du solide par Rotation à l'Angle Magique (MAS, Magic Angle Spinning). Cette méthode permet d'analyser des échantillons hétérogènes non solides. Elle a été originellement développée

par [Andrew 1958] et [Lowe 1959] et permet d'obtenir des spectres d'échantillons hétérogènes proches de ceux obtenus en liquide. En effet, un échantillon hétérogène analysé par RMN du liquide fournit des signaux de RMN relativement larges. L'élargissement de raies est directement lié aux interactions entre les noyaux dipolaires des molécules et l'orientation du champ magnétique ainsi qu'aux variations de susceptibilité magnétique hétérogène du milieu étudié. Comme nous l'expliquerons, une technique expérimentale permet de palier à ces problèmes, et par conséquent d'analyser bon nombre d'échantillons hétérogènes comme indiqué dans ce chapitre au travers des exemples d'applications de la RMN HR-MAS.

Le but de ce projet est d'utiliser cette technologie, dans un premier temps pour l'analyse de protéines sur phase solide. Puis de la développer pour une utilisation plus large, la mesure d'interaction entre une protéine et divers candidats à la compétition. La détermination des interactions protéine-ligand joue un rôle essentiel en drug discovery. Ces dernières années, bon nombre de chercheurs se sont intéressés à l'étude de ces interactions afin de trouver le meilleur compétiteur possible à la protéine d'étude. Ainsi, le screening de ligands est devenu une méthode très répandue. Pour cela diverses techniques de RMN du liquide ont été utilisées, des séquences ont été développées, mais la technologie HR-MAS reste relativement peu utilisée.

Dans ce chapitre, nous expliquerons ce qu'est la RMN HR-MAS et comment cette technique s'affranchit des élargissements de raies spectrales. Deux systèmes biologiques seront choisis, la protéine PDZ2/6 de MAGI-1 et HSP90 ainsi que plusieurs compétiteurs biologiques de choix. Après une introduction de ces systèmes biologiques, nous montrerons quelles séquences de RMN sont utilisées pour l'obtention d'un spectre RMN de qualité en un temps relativement court. La séquence à deux dimensions méthyl-SOFAST-HMQC sera détaillée, et comparée aux séquences 2D classiques sur deux spectromètres à RMN de champs différents. Enfin, des études d'interactions seront menées et les résultats obtenus seront discutés en fin de chapitre.

IV.1.1 Théorie de la RMN HR-MAS

Le principe de la RMN HR-MAS est généralement expliqué à l'aide d'Hamiltoniens. Nous avons pris le parti, ici, d'apporter une description moins formelle.

La largeur de raie d'un spectre RMN dépend de l'environnement microscopique des noyaux étudiés, et donc de plusieurs paramètres. Premièrement, les couplages dipolaires et le déplacement chimique sont des interactions spin-spin anisotropes dépendantes de l'orientation de la molécule par rapport au champ magnétique statique. Ils sont alors différents en phase liquide par comparaison à un échantillon hétérogène sous forme semi-solide. De plus, la susceptibilité magnétique du milieu et ses variations induites dans un échantillon hétérogène sont des facteurs d'élargissement de raies.

En phase liquide, le mouvement rapide des molécules rend isotrope le milieu puisqu'il moyenne les interactions anisotropes. Certaines géométries particulières "effacent" les élargissements dues aux variations de susceptibilité de l'échantillon. C'est le cas en particulier du cylindre infini parallèle à B_0 . Ainsi, l'analyse d'un échantillon liquide en RMN permet l'obtention d'un spectre présentant des raies

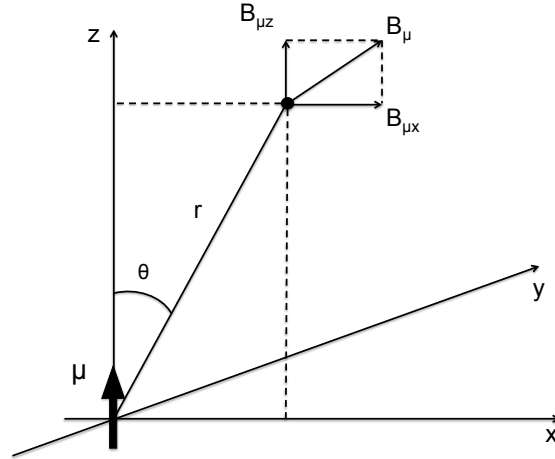


FIGURE IV.1 – Paramètres liés au champ généré par un dipôle magnétique μ dans le plan x,z . Voir équation IV.2

$$\begin{aligned} B_{\mu x} &= \left(\frac{\mu_0}{4\pi}\right)\left(\frac{\mu}{r^3}\right)(3\sin\theta\cos\theta) \\ B_{\mu y} &= 0 \\ B_{\mu z} &= \left(\frac{\mu_0}{4\pi}\right)\left(\frac{\mu}{r^3}\right)(3\cos^2\theta - 1) \end{aligned}$$

FIGURE IV.2 – Equation illustrant la figure IV.1, composantes de B_μ le long des axes x,y,z .

finies à une fréquence de déplacement chimique isotrope sans élargissement dû aux couplages dipolaires, sous réserve que l'échantillon soit placé parallèlement au champ statique.

IV.1.2 Le couplage dipolaire

Chaque noyau possédant un nombre quantique de spin non nul dispose d'un moment magnétique μ . Le couplage des moments magnétiques de deux noyaux dans l'espace produit ce que l'on appelle communément un couplage dipolaire. Afin de définir le champ magnétique généré par un dipôle, nous allons nous aider de la figure IV.1.

Un moment magnétique classique, μ , placé dans un plan x,y,z et orienté selon l'axe z va produire un champ magnétique B_μ (de symétrie cylindrique le long de z). Au point représenté, (r,θ) dans le plan $y = 0$, les composantes B_μ le long des axes x,y,z deviennent $B_{\mu x}$, $B_{\mu y}$, $B_{\mu z}$ définies selon les équations présentées en figure IV.2. Avec μ la magnitude du moment magnétique μ et μ_0 la perméabilité du vide. Notons, que le long de l'axe z ($\theta = 0$ ou 180°) B_μ devient parallèle à μ et le long de l'axe x (en $z=0$) B_μ est antiparallèle à μ .

La direction de B_μ est dépendante de θ alors que sa magnitude l'est de r (au travers de la distance $\frac{1}{r^3}$). À la position particulière de $3\cos^2\theta = 1$, $B_{\mu x}$ et $B_{\mu z}$ sont tels que B_μ est orthogonal à μ . On peut aussi le remarquer à l'aide des équations présentes en figure IV.2. Nous sommes en présence d'un tenseur de rang 2. Pour

rappel, un tenseur est un objet indépendant d'un système de coordonnées. C'est un opérateur liant dans un même repère deux grandeurs physiques en un même point d'un espace de dimension d . Un tenseur de rang 0 est un scalaire (il dépend de tout), un tenseur de rang 1 est un vecteur (il dépend de l'orientation), et par conséquent un tenseur de rang 2 est une forme bilinéaire décrite par une matrice (il dépend d'une double orientation).

IV.1.3 Généralisation du couplage dipolaire et tenseur de rang 2

Dans un couplage dipolaire, il y a une double dépendance angulaire, comme pour toute interaction non isotrope, ce sont donc des tenseurs de rang 2.

Afin de mieux comprendre ce qu'il se passe dans un échantillon hétérogène, prenons en considération le couplage dipolaire en phase solide puis en phase liquide.

Couplage dipolaire en phase solide : Les molécules sont statiques, chacune possède une valeur différente d'angle θ . Ce qui donne une distribution aléatoire des orientations dans le plan x, y, z . Dans un spectromètre à RMN, le champ magnétique B_0 est aligné selon l'axe z , les spins sont quantifiés le long de cet axe, voir figure IV.1. La fréquence de résonance est donc mesurée le long de z . Le spectre RMN obtenu est alors la somme de toutes ces orientations possibles (de $\theta = 0^\circ$ à $\theta = 90^\circ$), c'est-à-dire $B_0 \pm B_{\mu z}$. Le signal RMN obtenu est un spectre très large. En RMN du solide il n'est pas possible de s'abstraire de l'effet de couplage dipolaire. Deux cas se présentent en solide : soit nous sommes en présence d'un monocristal soit nous sommes en présence d'une poudre (ou verre). Dans le cas d'un monocristal, les angles spin-spin prennent des valeurs définies gouvernées par l'agencement dans le cristal, nous obtenons une série de raies de couplage. Dans le cas de poudres ou verres, toutes les orientations existent et nous avons une distribution continue de constantes de couplages, nous obtenons un spectre de poudre.

Couplage dipolaire en phase liquide : Le mouvement rapide des molécules en solution engendre un changement fréquent des axes, l'angle θ varie constamment au cours du temps. Cette fréquence de rotation d'une molécule en solution (exemple de l'eau à température ambiante : 10^{12} Hz) est bien plus élevée que le couplage dipolaire (les plus grands couplages dipolaires sont de l'ordre de 10^5 Hz). La dépendance angulaire est alors moyennée à 0, les couplages dipolaires ne sont pas visibles en liquide.

IV.1.4 Susceptibilité magnétique

La susceptibilité magnétique est le degré de magnétisation d'une matière sous l'effet d'un champ magnétique externe. La susceptibilité magnétique, χ dépend donc du champ magnétique appliqué. Ainsi, la réponse magnétique M de l'application de B_0 sur χ est dépendante de l'orientation de l'échantillon. Elle peut se produire dans d'autres directions que celle du champ B_0 , selon l'équation :

$$M_x = \chi_{xy} \overrightarrow{B_{0y}} \tag{IV.1}$$

Avec,

x et y les directions, M_x , la réponse magnétique (aimantation),

χ_{xy} , la susceptibilité magnétique et

\vec{B}_{0y} le champ appliqué selon l'axe y .

La susceptibilité magnétique représente la polarisation des spins, elle est donc macroscopique et microscopique. Le champ magnétique vu par le spin n'est pas homogène, tandis que B_0 l'est. C'est comme une interaction dipolaire spin-spin (spin matériaux) d'ordre 2, voir paragraphe précédent. χ_{xy} est un tenseur d'ordre 2.

IV.1.5 Angle magique et rotation

Angle magique Soit la fonction $P_2(x) = \frac{(3x^2-1)}{2}$, le polynôme de Legendre. L'angle magique est la racine carrée du Polynôme de Legendre du second ordre $P_2(\cos \theta) = 0$. La valeur précise de l'angle θ qui permet d'annuler ce polynôme de Legendre ($3 \cos^2 \theta - 1$) est de $54^\circ, 7$. Ainsi placer un échantillon à l'angle magique permet de supprimer toute interaction dépendante de ce polynôme.

La distorsion de susceptibilité magnétique est associée à une surface (entre deux volumes de matière de susceptibilités différentes). Si cette surface est quelconque (dans le cas d'un échantillon hétérogène), il n'y a pas de solution statique, les raies sont toujours larges. Si cette surface est un plan placé à l'angle magique avec B_0 la distorsion est nulle et les raies sont fines. En inclinant un cylindre tronqué à l'angle magique, les plans de troncature ne créent pas de distorsions. Soit, pour un rotor HR-MAS à l'arrêt une seule source de distorsion, la paroi du cylindre.

Rotation L'angle magique correspond à l'axe de symétrie 3 du cube. C'est à dire que tous les $\frac{1}{3}$ de tour, les axes x, y, z sont sans cesse interchangés. Le fait de perturber régulièrement les trois axes de l'espace revient à prendre une moyenne autour de $P_2(x)$ et donc effacer les élargissements (interactions) à la condition que la vitesse de rotation soit plus grande que l'élargissement. Le tenseur de rang 2 de susceptibilité magnétique devient indépendant de la direction du champ statique B_0 . Placer l'échantillon à cet angle et le mettre en rotation revient à rendre nulles les inhomogénéités de champ par une rotation plus rapide que l'interaction en jeu.

IV.1.6 La Haute Résolution

Afin d'obtenir des spectres de haute résolution il faut donc combiner tous ces paramètres.

Dans un premier temps, il faut placer l'échantillon à l'angle magique. Ceci est réalisé directement dans la sonde HR-MAS avec un stator basculant, voir figure IV.3. Ensuite, les largeurs de raies dans un milieu hétérogène étant de l'ordre de 10^3 Hz, il faut donc que la rotation soit plus rapide. Mais il faut aussi tourner moins vite que les interactions présentes en solide (couplages dipolaires de l'ordre de 50.10^3 Hz) afin que le signal relatif au solide reste large. La MAS permet d'effacer les interactions lentes, afin de récupérer le signal inhérent à la phase liquide, et perdre le signal relatif au solide. La vitesse de rotation de l'échantillon est de l'ordre

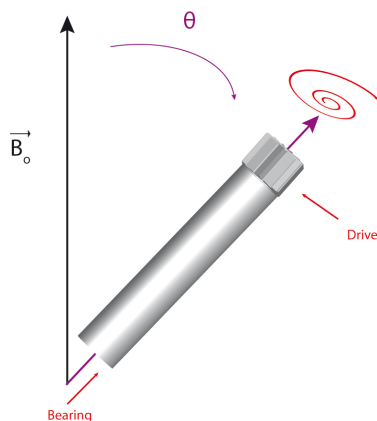


FIGURE IV.3 – Schéma du rotor HR-MAS basculé à l'angle magique θ par rapport au champ magnétique appliqué B_0 . Deux flux d'air assurent la lévitation (Bearing) et la mise en rotation du rotor (Drive). La rotation du rotor est rendue possible à l'aide des ailettes du bouchon. Voir annexe I.3 pour le matériel HR-MAS : sonde, rotor, outils.

de $\nu = 4000$ à 6000 Hz , intermédiaire entre l'interaction susceptibilité magnétique (~ 1 kHz) et les interactions dipolaires et quadrupolaires (~ 100 kHz).

Les expériences de RMN du liquide sont employées en HR-MAS. Un échantillon de référence est utilisé comme en RMN du liquide classique pour la calibration des impulsions et pour assurer un bon shim de la sonde par rapport à la position de l'échantillon.

Grâce à tous ces paramètres, nous pouvons réaliser de la RMN haute résolution sur des échantillons hétérogènes.

IV.1.7 Applications de la HR-MAS

La RMN HR-MAS trouve de nombreuses applications dans le domaine des sciences. Elle permet l'analyse d'échantillons dont l'état se situe à l'interface entre liquide et solide, ou encore d'échantillons hétérogènes (phases greffées). De manière non exhaustive, peuvent être analysés les échantillons sous forme de gel, certains polymères, tissus biologiques, cellules, résines, molécules greffées sur phase solide, produits issus de l'agronomie... Quelques applications rencontrées dans la littérature seront présentées ici.

Utilisée en premier lieu pour l'analyse de gels, [Chapman 1972] et solutions inhomogènes, [Dokocilová 1975], la RMN par HR-MAS a connu un véritable essor depuis l'introduction de la synthèse peptidique sur support solide, [Merrifield 1963]. Quelque soit le type de support solide employé, [Carvalho 2010] la HR-MAS ouvre une porte pour les chimistes et polyméristes en mal d'analyse de leur suivi de synthèse. C'est surtout pour cette application qu'elle a été développée, [Maas 1996], [Meissner 1997] et largement utilisée par la suite, [Fitch 1994], [Keifer 1996], [Yao 2004], [Ramadhar 2008], [Duchène 2010], [Luo 2011].

La RMN HR-MAS peut être utilisée comme méthode quantitative,

[Lucas 2004], [Joe 2008]. Cette technique est aussi appliquée en chimie combinatoire [Fassina 2005], [Abelson 2003], elle permet l'analyse de phases chirales, [Hellriegel 2004], et peut être employée pour divers types de synthèse sur support solide, [Furrer 2001], [Violette 2008], [Polito 2008], [Espinosa 2011]. De nombreuses publications dans ce domaine en font état, la liste présente ici n'est pas exhaustive.

Une étude récente présente l'analyse d'hydrogels formant des réseaux internes, [Shestakova 2011]. Les auteurs montrent que l'analyse de la morphologie de leur système est rendue possible par la RMN HR-MAS et prouvent ainsi l'évidence de la formation de réseaux de gels "connectés" plutôt qu'indépendants.

Une autre grande application de la HR-MAS est faite en métabolomique pour l'analyse de métabolites et de tissus, [Chen 2004], [Pampel 2004], [Lucas 2005], [Li 2005], [Martínez-Granados 2006], [Chen 2006], [Righi 2009], [Tessem 2010], [Renault 2013], [Elbayed 2013]. Cette méthode permet d'analyser de nombreux tissus intacts, sans transformation de l'échantillon, en un temps restreint.

Parmi les applications rencontrées dans la littérature, nous retrouvons la technologie HR-MAS au service des micro-algues pour des analyses de composition, [Chauton 2008], [Trond Røvik Størseth 2008], [Ruhl 2011] et également pour des analyses de sols, [Simpson 2001]. Des applications liées au domaine de la cosmétique sont aussi recensées, mais elles sont peu publiées, [Marzorati 2013]. Tandis que celles du domaine de l'agroalimentaire sont plus partagées, avec l'analyse de fromages, [Shintu 2004], [Shintu 2005], [Shintu 2006], entre autres applications [Valentini 2011].

Concernant l'analyse de protéine greffée, [Klein 1999], peu de données sont référencées, seuls *Viel et al* en 2012, [Ziarelli 2012], ont exploré ce domaine. Nous n'avons pas recensé dans la littérature une observation directe de protéine greffée par RMN HR-MAS.

IV.2 Système biologique utilisé pour l'étude

La production de protéines recombinantes portant un tag (molécule liante spécifique, en position N-ter ou C-ter) permet d'accélérer la purification des protéines par usage de colonnes d'affinités très sélectives. Ces protéines sur lesquelles sont ajoutées une étiquette sont des protéines dites de fusion. Les protéines de fusion sont une combinaison de deux protéines ou parties de protéine. De nos jours, elles sont largement utilisées, en particulier pour renforcer la stabilité de la protéine et pour optimiser l'étape de purification des protéines. Ce dernier usage nécessite cependant une étape de clivage du tag après l'étape de purification pour les analyses par RMN. Divers tag sont présents sur le marché, tels le tag Histidine (**His-tag**), le Maltose (MBP, Maltose Binding protéin), la Glutathion (**GST**, Glutathion S-Transferase) et bien d'autres encore. Le tag Histidine est utilisé avec une colonne spécifique greffée avec des ions nickel ou des ions cobalt. Le tag MBP est utilisé avec une colonne spécifique greffée avec des maltoses, et la protéine GST s'utilise avec une colonne greffée avec du Glutathion.

Pour l'étude par RMN de protéine sur phase greffée, nous avons fait le choix d'un tag peu encombrant, dont l'éventuel signal ne puisse interférer avec celui de

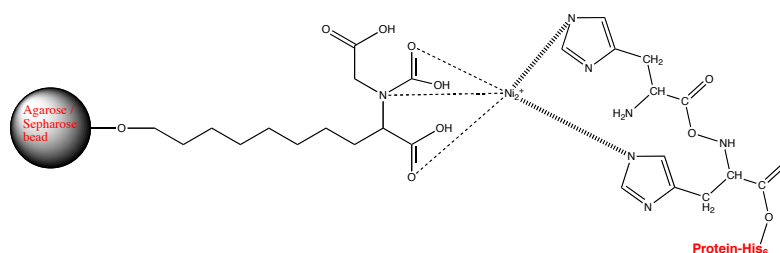


FIGURE IV.4 – Schéma de la fixation du His-tag sur une colonne de nickel dont les billes sont de phase Agarose ou Sépharose

notre protéine (selon la taille de la protéine d'étude). Le paramètre à prendre en compte est aussi la méthode de fixation sur la colonne. Les colonnes au cobalt sont à bannir en RMN, de même que les colonnes de faible affinité.

Le tag poly-histidine (**His-tag**) est un tag relativement court et principalement désordonné en solution dans un solvant. Ainsi, il peut être laissé sur une protéine pour les études biophysiques. Les **His-tag** ont la capacité à se fixer aux ions Nickel présents sur une colonne d'affinité, voir figure IV.4.

Nous avons choisi ce tag pour notre étude de protéine sur phase solide, avec utilisation de colonnes au nickel.

IV.2.1 Protéine PDZ2/6

Pour cette étude, nous avons choisi de travailler sur PDZ2/6 qui est un domaine de la protéine MAGI-1 (Membrane Associated Guanylate kinases with Inverted domain-1).

Les domaines PDZ sont des domaines d'interaction protéine-protéine situés principalement dans les protéines cytoplasmiques impliquées dans les voies de signalisation du transport intracellulaire, [Cho 1992], [Kim 1995]. Les protéines virales ciblent souvent les domaines PDZ ce qui perturbe le processus cellulaire au profit du cycle de vie virale, [Roh 2003], [Jelen 2003].

Les domaines PDZ ont habituellement quatre vingt dix acides aminés et forment un domaine globulaire bien défini. Il est composé de six feuillets β entre deux hélices α , [Doyle 1996]. Entre le second feuillet et la seconde hélice, se trouve un sillon reconnaissant de courts motifs portant un groupe carboxylique COOH, [Songyang 1997].

Les domaines PDZ sont des cibles de protéines virales. Ceci implique une perturbation des voies cellulaires, par exemple pour le papillomavirus humain (hrmHPV, oncogenic high risk mucosal Human Papillomaviruse) impliqué dans le cancer du col de l'utérus.

Le type 16E6 du hrmHPV, porte un motif de liaison PDZ C-terminal (PBM, PDZ binding motif) avec la séquence consensus RSSRTRRETQL, [Kiyono 1997] par l'intermédiaire duquel il vise les domaines PDZ. Il s'agit d'une des activités les plus importantes du cycle de vie du hrmHPV et de son évolution vers des phénotypes de cancer, [James 2006], [Shai 2007].

La protéine MAGI-1 est impliquée dans la formation de cellules de jonction dans les cellules épithéliales et porte six domaines PDZ nommés PDZ1-PDZ6, [Luck 2012]

```

      1          10          21          31
KHHHHHHPMG KPFSTRNPSE LKGKFIHTKL RKSSRGFGFT VVGGDEPDEF LQIKSLVLDG

      61          81          91          101
PAALDGKMET GDVIVSVNDT CVLGHTHAQQ VKIFQSIPIG ASVDLELCRG YPLPFDPPDP

111          121
NTSLVTSVAI LDKEP

```

FIGURE IV.5 – Séquence d'acides aminés de la protéine PDZ2/6 produite pour cette étude par RMN HR-MAS.

(parfois nommés PDZ0-PDZ5 dans la littérature, [Dobrosotskaya 1997]).

Le système PDZ en interaction avec des peptides est un modèle pratique en biologie structurale. Les peptides sont facilement synthétisables, et le domaine PDZ est petit, facile à produire et à purifier, ce qui rend ce système très intéressant pour notre étude par RMN HR-MAS.

Le PDZ2/6 étudié contient 135 amino acides pour un poids moléculaire de 14,8 kD. La séquence de ce PDZ est détaillée en figure IV.5, l'image tridimensionnelle de PDZ2/6 obtenue à l'aide du logiciel PyMOL est présentée en annexe I.1.

Le but de cette étude est l'analyse des interactions protéine ligand sur phase greffée. Après analyse de PDZ2/6 par HR-MAS, nous nous intéresserons au suivi de l'interaction de cette protéine avec quatre peptides choisis en accord avec la littérature, [Charbonnier 2008], [Charbonnier 2011], [Fournane 2010], [Luck 2011]. Deux peptides à onze résidus et un peptide à cinq résidus sont choisis en complément d'un peptide témoin en fonction de leur K_d . Le plus petit peptide, RETQL dont le K_d est proche de $10 \mu\text{M}$ est le moins affiné. Le premier peptide à onze résidus est le RSSRRTRRETQL avec un K_d proche de $1,2 \mu\text{M}$ sera nommé R16L. Le second, RSSRRTRRETQV est la modification chimique de la lysine du R16L par une valine, il est nommé R16LV. R16LV offre une affinité de $K_d=0,4 \mu\text{M}$, il est le plus affiné de la sélection. Enfin, le peptide WGSNSGNGNS est utilisé comme témoin négatif.

IV.2.2 Préparation des échantillons, expressions, purifications

Le PDZ1 est exprimé de deux façons différentes dans des cellules d' E. Coli à partir des plasmides peTM10. L'expression est réalisée à deux températures, 27°C et 16°C , dans le milieu de culture BL21. La culture portée à 16°C est réalisée sur une nuit. Le milieu de culture est doublement marqué en carbone ^{13}C et azote ^{15}N . Après sonication, le culot de culture est récupéré par centrifugation. Les culots sont repris en tampon phosphate 20 mM (pH=6,8) puis purifiés sur une colonne de nickel (IMAC, Immobilized Metal Affinity Chromatography) suivie d'une ultracentrifugation et d'une colonne d'exclusion stérique. L'expression est contrôlée par gel SDS, voir annexe I.2 et la protéine est quantifiée par lysozyme en utilisant la méthode PULCON, [Wider 2006].

La phase solide est choisie en accord avec le tag Histidine présent sur PDZ2/6.

Nous choisissons les phases Ni-NTA (Nickel NitriloTriAceticacid, Qiagen) et Nickel Fast Flow (GE Healthcare). Ces phases se présentent sous la forme de petites billes et leurs caractéristiques sont différentes. La phase Ni-NTA possède une forte capacité de greffage (50mg/mL annoncé) et doit être utilisée préférentiellement pour des purifications en bain. La phase est composée de billes d'Agarose de taille comprise entre 45 μm et 165 μm . La phase Nickel Fast Flow a aussi une grande capacité de greffage (40mg/mL) et engendre un faible relarguage des ions nickel. Elle est composée de billes de Sépharose de taille proche de 90 μm avec des pores dont la taille est supérieure à 100 Å. La phase Fast Flow est optimisée pour l'analyse d'échantillons bruts (lysats bactériens).

Une fois la phase choisie et la protéine produite et purifiée, nous procédons à la mise en rotor HR-MAS de la protéine. Le protocole est détaillé en figure IV.6, et le matériel HR-MAS est présenté en annexe I.3.

Premièrement, la phase solide est lavée de ses solvants de conservation (dont l'éthanol) par cycles de lavages/centrifugations à l'eau puis au tampon d'analyse de la protéine. Afin d'assurer un taux de greffage maximal, la protéine est mise en excès par rapport à la capacité maximale théorique de la phase. Puis la protéine, en solution dans son tampon, est mise en contact de la phase solide. Le mélange est doucement agité à température ambiante pendant environ vingt minutes. La protéine greffée sur les billes de nickel est ensuite séparée du reste de tampon par une douce centrifugation suivie d'une décantation. Les billes sont récupérées et introduites dans le rotor HR-MAS pour analyse avec 10% de D₂O. Les concentrations sont données relativement par rapport au volume du rotor total sans phase solide. Les phases choisies étant extrêmement poreuses, le volume exclu est considéré très faible. Les rotors HR-MAS utilisés ici possèdent un volume interne de 50 μL .

Les expériences préliminaires d'HR-MAS sont réalisées dans des conditions différentes avec des échantillons issus des diverses cultures de PDZ2/6 doublement marqué ou non. Les concentrations de protéine seront données au cas par cas selon l'étude HR-MAS concernée. Cependant, les mesures d'interaction avec les peptides sont réalisées dans les mêmes conditions, avec la même culture de PDZ2/6 doublement marqué ¹³C et ¹⁵N. Ces expériences sont effectuées dans un rotor HR-MAS de 50 μL avec 200 μg (11nmol) de protéine, correspondant à une concentration de 230 μM .

IV.2.3 Préparation des peptides utilisés pour les interactions

La synthèse des peptides est réalisée par le service peptidique de l'IGBMC. Ils sont synthétisés en phase solide en utilisant la chimie Fmoc. Les peptides bruts sont ensuite purifiés par chromatographie liquide en phase inverse. Leur pureté est contrôlée par spectrométrie de masse.

L'aliquot de peptide reçu est ensuite déssalé sur une colonne de type Sephadex, puis lyophilisé. L'échantillon est repris dans du tampon phosphate pour être quantifié par RMN du liquide avant les analyses par HR-MAS.

Les peptides RETQL, R16L, R16LV et WGSNSGNGNS sont mis séparément en interaction avec la protéine PDZ2/6 selon le protocole présenté en figure IV.7.

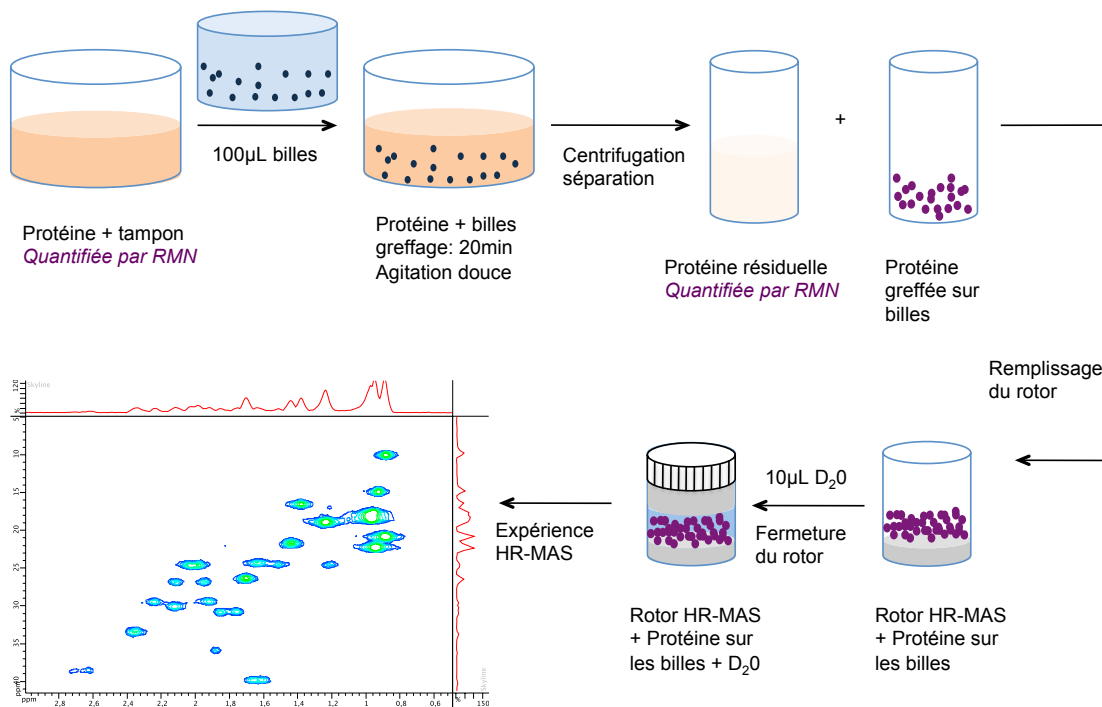


FIGURE IV.6 – Préparation du rotor de protéine pour l'analyse par HR-MAS.

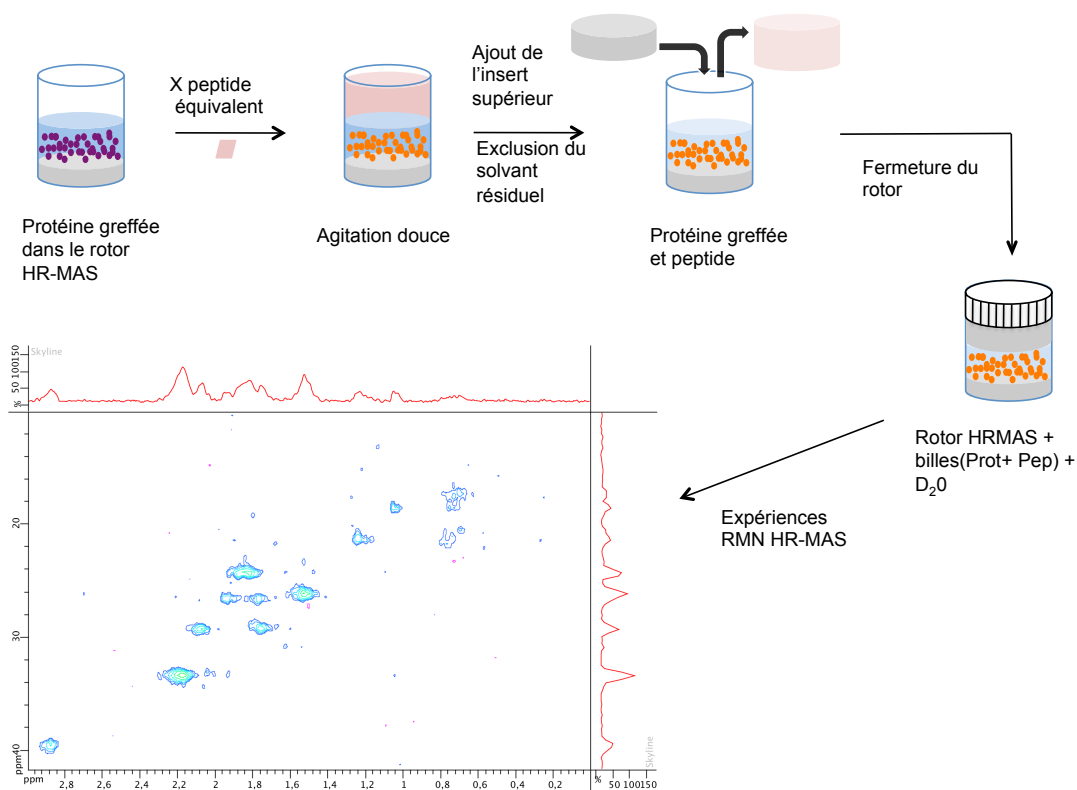


FIGURE IV.7 – Préparation et mise en interaction du peptide avec PDZ2/6 pour l'analyse par HR-MAS.

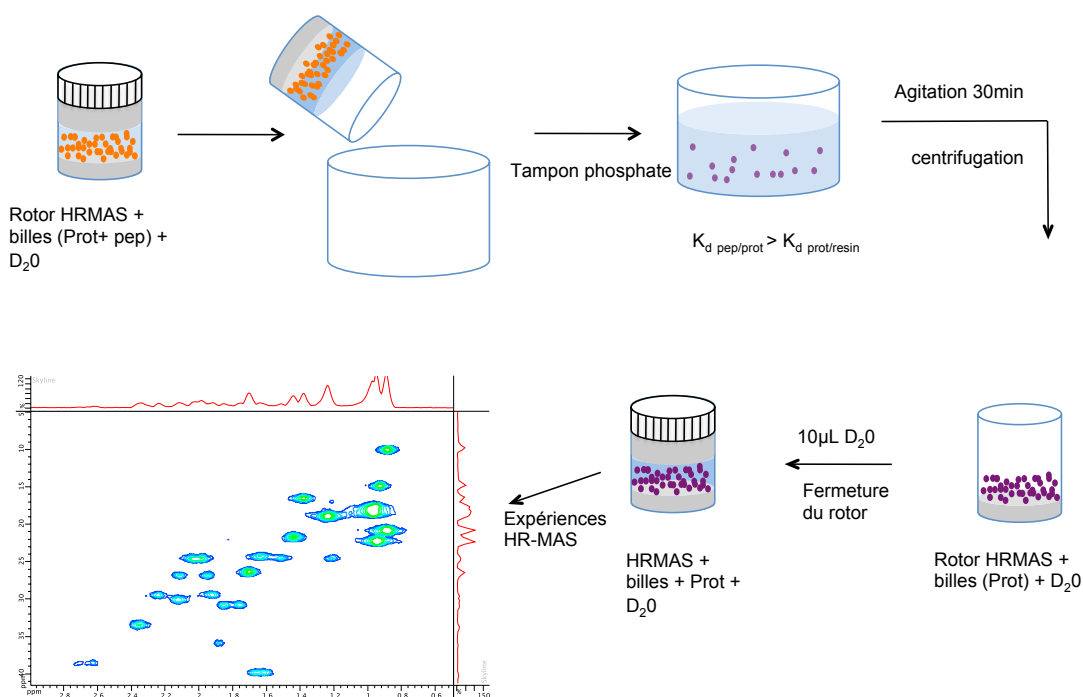


FIGURE IV.8 – Protocole de l'échange de ligands entre deux mesures d'interaction.

Une fois le peptide le moins affiné étudié, nous procédons à l'échange de ligand selon le schéma proposé en figure IV.8. Le contenu du rotor est placé dans un grand volume de tampon phosphate afin de relarguer le peptide. Puis les billes sur lesquelles est toujours greffée la protéine sont introduites dans le rotor. Nous réalisons ensuite un spectre RMN de la protéine avant d'ajouter le nouveau ligand selon le procédé de la figure IV.8.

Les mesures d'interactions sont réalisées avec un excès de peptide par rapport au PDZ2/6. Le peptide RETQL est placé à 2,2 équivalents de PDZ2/6, le peptide WGSNSGNGNS à 2 équivalents. Les peptides R16LV et R16L sont placés à 4 et 4,6 équivalents de PDZ2/6 respectivement.

IV.2.4 Protéine HSP90

Une deuxième protéine est choisie pour réaliser une étude sans marquage isotopique. La protéine HSP90 (Heat Shock Protein) est une protéine chaperonne du bon repliement conformationnel des protéines qu'elle assiste, [Wiech 1992]. Elle stabilise les protéines contre le stress thermique et les dégradations.

HSP90 est l'une des plus abondantes protéines cytosoliques présentes dans les cellules eucaryotes. C'est une protéine très étudiée en biophysique, [Buchner 1999], [Whitesell 2005], [Pearl 2006], [Dutton 2014], [Wahyudi 2014].

Pour les besoins de cette étude HSP90, est produite par les biologistes de la société Novalix. Elle est exprimée en cellules E. Coli à partir de vecteurs pET28b. La protéine que nous étudions est un domaine de HSP90, possédant 256 résidus aminés pour un poids moléculaire de 28,7kD. Sa séquence est présentée en figure

```

1
MGSSHHHHHH  SSGLVPRGSH  MPEETQTQDQ  PMEEEEVETF  AFQAEIAQLM
51
SLIINTFYSN  KEIFLRELIS  NSSDALDKIR  YESLTDPSKL  DSGKELHINL
101
IPNKQDRTLT  IVDTGIGMTK  ADLINNLGTI  AKSGTKAFME  ALQAGADISM
151
IGQFGVGFYS  AYLVAEKVTV  ITKHNDDEQY  AWESSAGGSF  TVRTDTGPEM
201
GRGTKVILHL  KEDQTEYLEE  RRIKEIVKHH  SQFIGYPITL  FVEKERDKEV
251
SDDEAE

```

FIGURE IV.9 – Séquence d’acides aminés de la protéine HSP90 pour l’étude HR-MAS.

IV.9. Le tag, présent en N-ter, est aussi un His-tag, les phases solides seront donc les mêmes que celles choisies pour PDZ2/6. C’est-à-dire NiNTA et Fast Flow, toutes deux des colonnes au nickel.

Les expériences HR-MAS sont effectuées dans un rotor HR-MAS de 50 μL avec 1 mg (38 nmol) de protéine, correspondant à une concentration de 700 μM .

La protéine HSP90 possède deux ligands fort connus, le radicicol et la geldanamycine, [Roe 1999]. Ces ligands seront mis en contact de l’HSP90 lors de l’étude d’interactions par HR-MAS.

IV.3 Analyses HR-MAS de protéines

Les analyses HR-MAS sont réalisées sur deux spectromètres RMN différents. NMRTEC dispose d’un spectromètre Bruker Avance 400 MHz équipé d’une sonde inverse standard de HR-MAS dont l’impulsion proton 90° est de 8,50 μs à 15 W. La vitesse de rotation de l’échantillon dans cette sonde est de $\nu = 4000$ Hz. Grâce à la fédération des Très Grandes Infrastructures de Recherche Très Haut Champs (TGIR) nous avons eu la possibilité d’utiliser un spectromètre Bruker Avance III 800 MHz équipé d’une sonde inverse HR-MAS au sein du Centre de RMN à très Haut Champs de Lyon. Sur ce spectromètre, l’impulsion 90° du proton est de 11,3 μs à 18 W. La vitesse de rotation de l’échantillon dans cette sonde est de $\nu = 6000$ Hz.

Toutes les expériences de RMN HR-MAS sont réalisées à température ambiante : 298 K. Les expériences sont réalisées en fonction du temps qui nous est attribué sur chaque spectromètre, toutes les expériences n’ont pu être enregistrées sur le spectromètre de plus haut champ magnétique.

IV.3.1 Expériences HR-MAS en phase liquide

Dans un premier temps la protéine PDZ2/6 est analysée en phase liquide, sans avoir été préalablement greffée sur support. Nous disposons d’un échantillon de

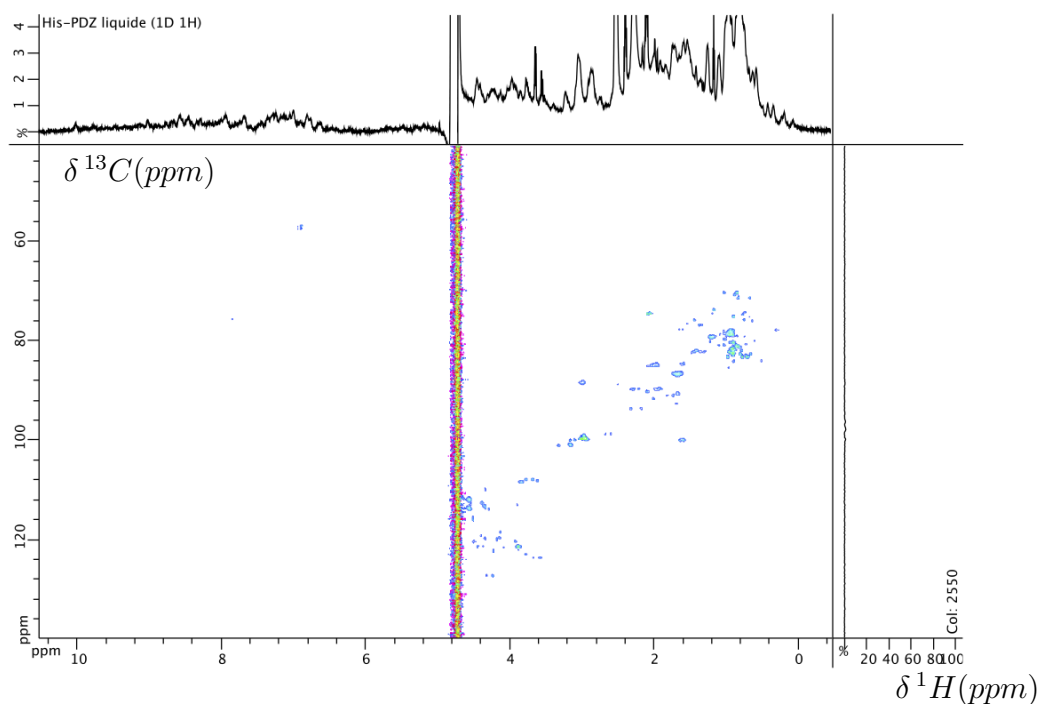


FIGURE IV.10 – Spectre 2D ^1H - ^{13}C HSQC de PDZ2/6 doublement marqué réalisé à 800 MHz. PDZ2/6=70 μg , temps d’expérience de 6 heures.

70 μg , 175 μM de PDZ2/6 et du spectromètre RMN 800 MHz. Nous réalisons une expérience 2D ^1H - ^{13}C HSQC, dont le spectre est présenté en figure IV.10.

A l’aide du spectre 1D proton, présenté en annexe J.1, nous vérifions la présence de la protéine et confirmons son bon état avant greffage sur phase.

L’acquisition d’une HSQC prend beaucoup de temps, ici elle est acquise en 6 heures sur le spectromètre de plus haut champ avec une protéine marquée ^{13}C . Cette même carte HSQC serait bien plus longue à obtenir sur le spectromètre 400 MHz, voire impossible pour la protéine HSP90 non marquée ^{13}C . La finalité de cette étude étant de suivre une interaction entre la protéine et un ligand, il est plus que nécessaire de trouver une séquence de RMN nous permettant un temps d’acquisition plus court. Il est à noter par ailleurs que les sondes des spectromètres 400 MHz et 800 MHz ne possèdent pas de canal ^{15}N . Nous nécessitons une séquence qui soit à la fois sensible et rapide, en excluant l’étude du noyau ^{15}N .

Une séquence de RMN récemment développée répond à ces critères, la SOFAST-HMQC, [Schanda 2005a] détaillée ci après.

IV.3.2 Méthyl-SOFAST-HMQC

La séquence de RMN SOFAST-HMQC, (*band-Selective Optimized Flip Angle Short-Transient heteronuclear multiple quantum coherence*) est une expérience à deux dimensions ^1H - ^{13}C qui augmente de manière considérable la sensibilité des spectres RMN.

Dans un premier temps, le développement d’une séquence HSQC rapide, basée sur

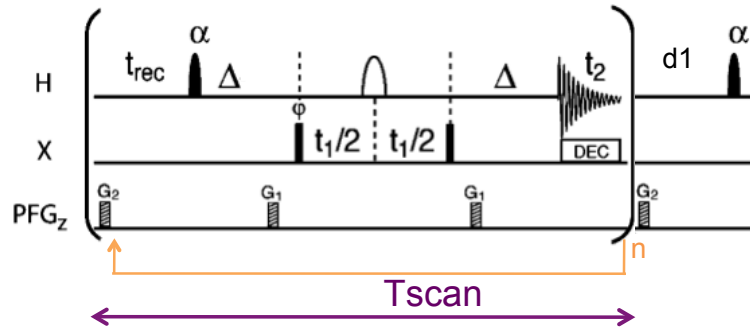


FIGURE IV.11 – Séquence d’impulsion de l’expérience SOFAST-HMQC.

une impulsion différente de 90° en utilisant l’angle de Ernst, [Ross 1997] permet une augmentation de la vitesse d’analyse. L’angle de Ernst, α est un angle particulier pour lequel les spins donnent un maximum de signal en un minimum de temps. Il est relié au délai $d1$ entre deux pulses, à la relaxation longitudinale T_1 et au temps d’acquisition aq selon la relation suivante :

$$\cos(\alpha) = e^{-\frac{d1+aq}{T_1}} \quad (\text{IV.2})$$

Avec $d1+aq$ le temps de répétition de l’expérience RMN. En 2005, [Schanda 2005a] met au point la séquence SOFAST-HMQC, en combinant les avantages d’une impulsion à l’angle de Ernst et d’une impulsion sélective. Une impulsion sélective en début de séquence améliore grandement la rapidité d’acquisition et la qualité de spectres. L’impulsion sélective est réalisée sur les groupements méthyles (lors d’une étude en ^{13}C), et sur les amines en analyse ^{15}N . L’impulsion sélective sur un type de spins particulier permet un retour plus rapide à l’état d’équilibre des spins excités grâce au bain d’aimantation disponible des spins non excités.

La SOFAST-HMQC est très utilisée en RMN du liquide pour l’étude de protéines, [Schanda 2005b], [Amero 2009], [Quinternet 2012]. A notre connaissance, elle n’a pas été utilisée en HR-MAS pour l’analyse de protéines sur phase solide. L’enjeu sera ici de prendre en main cette séquence puis d’analyser nos échantillons hétérogènes de protéine sur phase.

IV.3.2.1 Séquence d’impulsion

La séquence est détaillée en figure IV.11.

La première impulsion sélective, α , sur les protons méthyles bascule l’aimantation et amène une composante dans le plan xy . Les spins précessent dans le plan xy pendant le délai Δ . L’impulsion 180° renverse les spins le long le x dans une position symétrique du plan xy . La précession des spins continue durant le délai Δ . A la fin du délai, les spins des méthyles reviennent en phase, tel un écho de spin. Les deux impulsions 90° sur le canal carbone permettent aux déplacements chimiques carbone (de ceux liés aux méthyles) de s’exprimer durant le délai t , tandis que l’effet des couplages ^1H - ^{13}C est refocalisé. Pendant cette période t , l’aimantation est dans un état multi quanta. La période de mélange Δ permet un retour à l’état simple quanta et une remise en phase des aimantations. Il est important lors de l’utilisation

de cette séquence qu'aucune impulsion ^1H ne perturbe le signal de l'eau. Celui-ci doit rester le long de l'axe z afin de servir de réserve d'aimantation. C'est pour cette raison que toutes les impulsions ^1H sont sélectives sur les spins observés.

L'impulsion sélective sur les méthyles est de type PolyChromatique PC9, [Kupče 1994]; Sur le spectromètre 800 MHz, cette impulsion a une durée de 3130 μs que l'angle α soit placé à 90° ou à 120° . Sur le spectromètre 400 MHz, l'impulsion PC9 dure 4695 μs à $\alpha=90^\circ$, 120° , ou 150° .

La deuxième impulsion proton de 180° est de forme Rsnob, avec une durée de 972 μs sur le 800 MHz et 3634 μs sur le 400 MHz.

IV.3.2.2 Optimisation de la séquence

Comme cette séquence utilise des impulsions sélectives avec un angle variable, quelques paramètres sont à mettre au point. Premièrement, nous devons choisir la fenêtre spectrale de la zone de sélection des protons méthyles. La fenêtre spectrale sera différente sur les deux spectromètres. La largeur spectrale sur le 800 MHz sera de 3 ppm avec une impulsion centrée à 1,7 ppm. La largeur spectrale sur le 400 MHz sera de 4 ppm avec une impulsion centrée à 1,4 ppm.

Afin de déterminer la performance de l'expérience méthyl-SOFAST-HMQC sur le spectromètre 400 MHz, des courbes d'optimisation sont enregistrées en faisant varier deux paramètres : l'angle de l'impulsion sélective et le temps de scan. Un exemple de spectre obtenu est montré en figure IV.12.

La figure IV.13 montre le rapport signal sur bruit (SNR) à un temps total d'expérience constant en fonction de la durée d'une seule répétition (T_{scan}) pour un échantillon de PDZ2/6 marqué ^{13}C fixé sur la phase Fast Flow. Chaque point est calculé en prenant en compte le nombre de scans appliqué, et en mesurant l'intégral de plusieurs signaux dans la fenêtre 1,2-2,5 ppm.

L'angle α est testé à trois valeurs, 90° , 120° et 150° . Le temps d'expérience total est de 1 heure et 10 minutes. Nous notons sur ces courbes un maximum du rapport signal sur bruit pour un taux de répétition de 250 msec quelque soit l'angle utilisé. Cependant, sur cet échantillon, nous remarquons que l'utilisation d'un angle α de 90° est plus judicieux car il montre un SNR plus élevé.

En annexe J.3 sont montrés les résultats de la même optimisation sur un échantillon d'HSP90 non marqué sur le 400 MHz ainsi qu'un exemple de spectre SOFAST-HMQC, J.4. Les spectres sont obtenus en 4 heures et 42 minutes. Cette optimisation est aussi réalisée sur le 800 MHz, elle sera détaillée dans la partie suivante.

Ces résultats d'optimisation de la séquence SOFAST-HMQC nous démontrent que l'observation d'une protéine sur phase greffée est possible. Puisque nous obtenons des spectres avec un échantillon de protéine sur une phase solide. La méthode SOFAST peut être adaptée à un échantillon hétérogène en analyse HR-MAS.

Une fois la séquence mise au point, nous réalisons nos expériences d'analyse de protéine sur phase greffée, puis les études d'interaction.

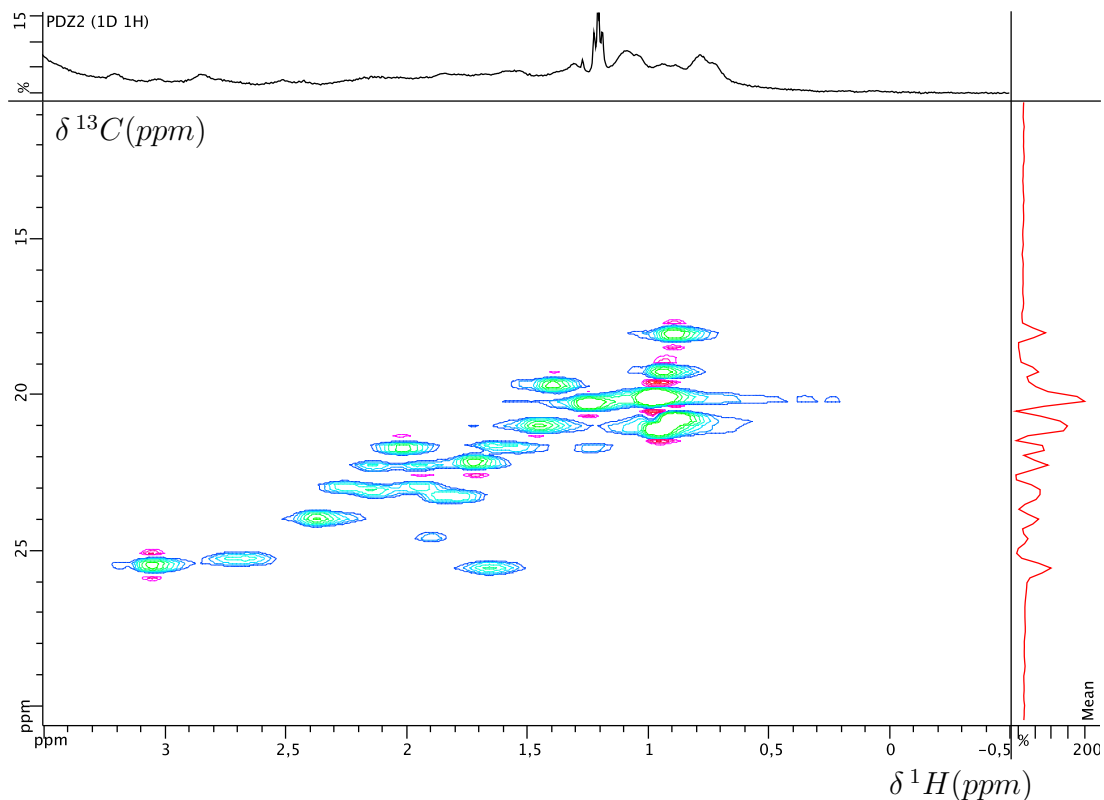


FIGURE IV.12 – Spectre 2D ^1H - ^{13}C méthyl-SOFAST-HMQC du PDZ2/6 sur phase Fast Flow. $\alpha=120^\circ$, NS=64, $d1=0,449\text{sec}$, $[\text{PDZ2/6}]=500\ \mu\text{M}$ pour un temps total d'expérience de 1 heure et 10 minutes à 400 MHz.

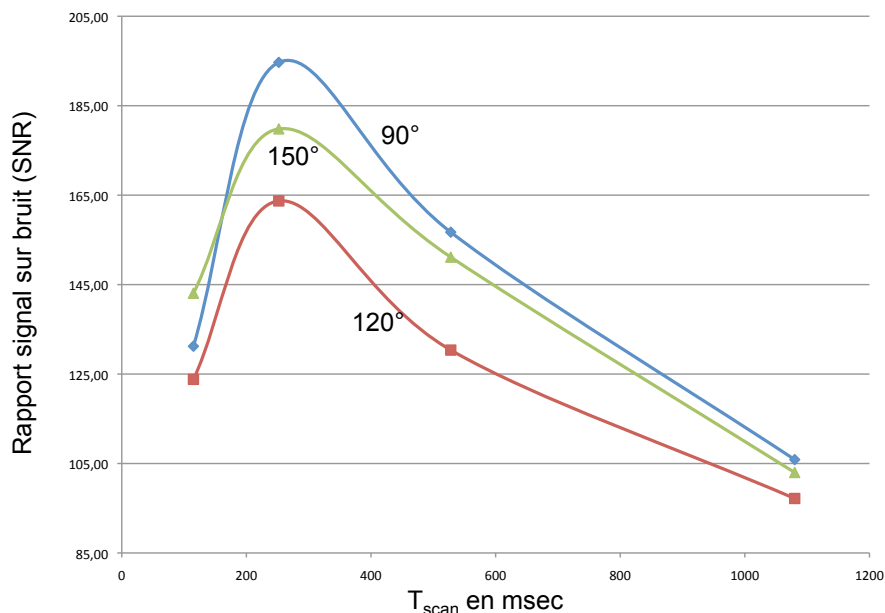


FIGURE IV.13 – Courbes du rapport Signal sur Bruit (SNR) en fonction du taux de répétition T_{scan} en milisecondes. L'angle α est testé à trois valeurs, 90° pour la courbe bleue, 120° pour la courbe rouge et 150° pour la courbe verte. Mesures à 400 MHz.

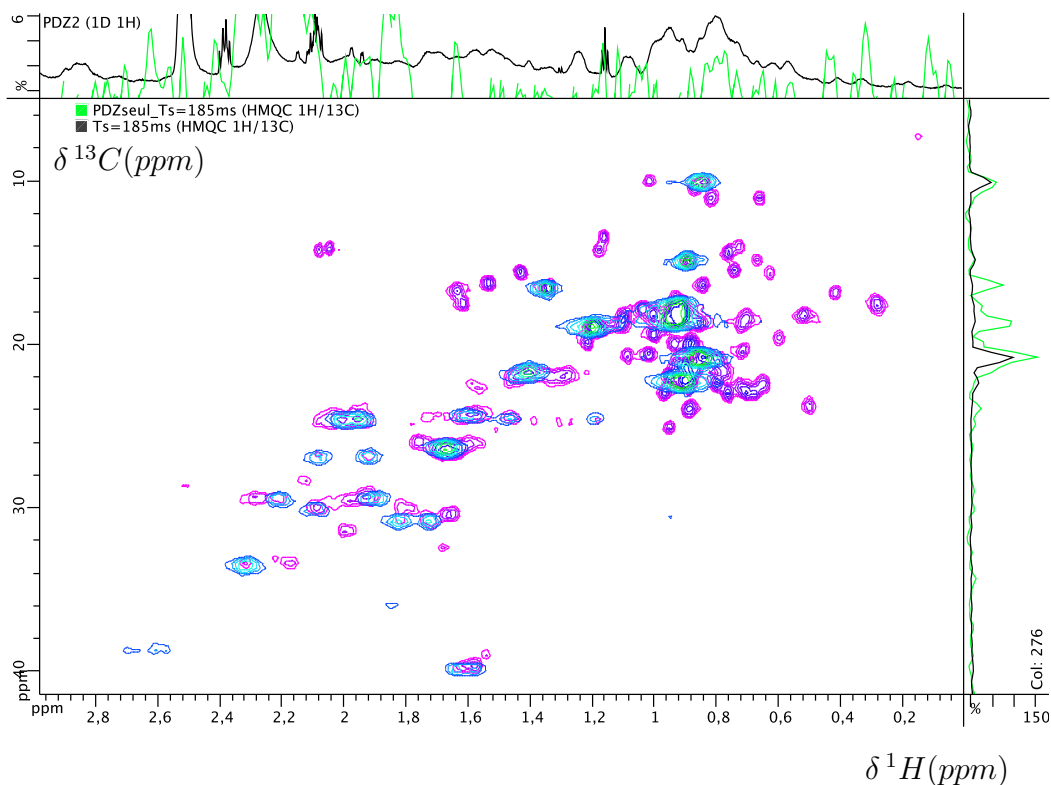


FIGURE IV.14 – Spectres 2D ^1H - ^{13}C méthyl-SOFAST-HMQC du PDZ2/6 réalisé à 800 MHz. Le spectre bleu correspond au PDZ2/6 sur phase NiNTA. Le spectre rose correspond au PDZ2/6 en solution. $\alpha=120^\circ$, NS=10, $d_1=105$ msec, $[\text{PDZ2/6}]=230 \mu\text{M}$ pour un temps total d'expérience de 4 minutes et 18 sec.

IV.3.3 Expériences HR-MAS en phase greffée

La protéine PDZ2/6 non greffée, dont l'HSQC a été réalisée à 800 MHz est analysée avec l'expérience de méthyl-SOFAST-HMQC.

Une première méthyl-SOFAST-HMQC est enregistrée sur l'échantillon liquide à $230 \mu\text{M}$. Le temps total d'acquisition est de 4 minutes et 8 secondes, $\alpha=120^\circ$, $d_1=105$ msec et NS=10, 128 incréments. Puis nous réalisons la même expérience avec les mêmes conditions expérimentales sur le PDZ2/6 greffé sur la phase NiNTA. La figure IV.14 regroupe les deux cartes 2D en superposition. Les taches de corrélation roses correspondent au PDZ2/6 liquide, et les taches bleues correspondent au PDZ2/6 sur phase NiNTA.

Nous notons la disparition de signaux sur le spectre de la protéine greffée. A l'aide de l'attribution réalisée par RMN du liquide, [Charbonnier 2006], nous pouvons attribuer les signaux visibles en HR-MAS. Le spectre et son attribution sont présentés en figure IV.15.

Avec l'attribution, nous remarquons que seule la partie C-ter du PDZ2/6 est visible. Cette partie est la partie terminale mobile, non structurée de la protéine [Nominé 2005].

Sur ce même spectromètre 800 MHz, sont réalisés des optimisations de la sé-

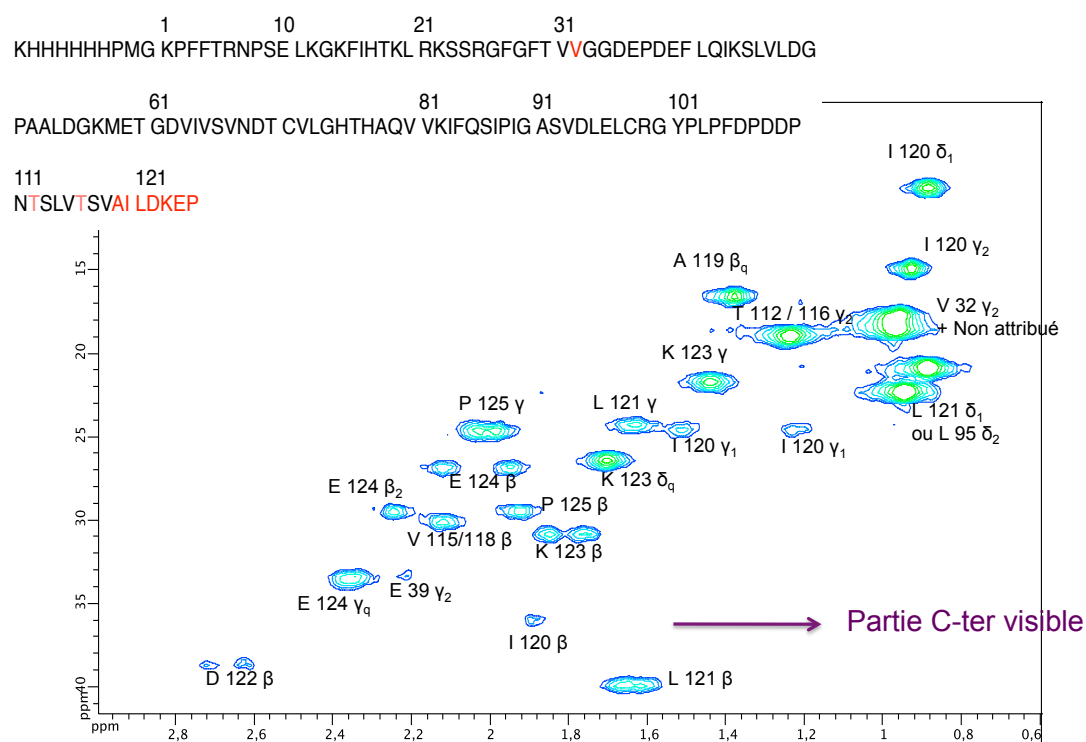


FIGURE IV.15 – Attribution du spectre 2D ^1H - ^{13}C méthyl-SOFAST-HMQC du PDZ2/6 greffé sur NiNTA. Rappel de la séquence du PDZ2/6 en insert, les acides aminés notés en rouge sont ceux présents sur le spectre HR-MAS.

quence SOFAST-HMQC avec le PDZ2/6 sur les deux phases mobiles sélectionnées, par comparaison avec le PDZ2/6 non greffé en solution. Les mêmes expériences que lors de l'optimisation sont effectuées, le rapport signal sur bruit est mesuré en fonction du taux de répétition T_{scan} . Les courbes résultantes de ces optimisations sont présentées en partie IV.4. Nous notons que les courbes du SNR en fonction du T_{scan} sont différentes si l'on travaille avec un échantillon greffé sur une phase mobile. Les courbes d'optimisation sur phase NiNTA et Fast Flow indiquent une hausse nette du SNR pour de très courts taux de répétition. Par ailleurs, la phase solide a aussi une importance, puisque ces courbes indiquent une forte influence sur le SNR en fonction de la phase sur laquelle est greffée la protéine. Dans cette étude sur PDZ2/6, la phase mobile NiNTA offre un meilleur SNR pour un T_{scan} court.

Cette étude démontre qu'en travaillant sur une phase mobile pour l'étude d'une protéine, la réponse en SOFAST-HMQC est bien meilleure. Le SNR est plus élevé pour les PDZ2/6 greffés sur phase, il peut dépasser les 55, tandis qu'en liquide le meilleur SNR est de 33. Ces résultats indiquent qu'un gain peut être apporté en travaillant sur des échantillons greffés sur phase.

Suite à l'étude de PDZ2/6 greffé par RMN HR-MAS, nous réalisons une étude d'interaction. Pour cela nous utilisons les peptides présentés en partie IV.2.3. Le premier peptide testé est le peptide RETQL. Il est mis en interaction avec le PDZ selon la figure IV.7. Le rotor contenant la protéine greffée et le peptide est analysé sur le 800 MHz avec la séquence méthyl-SOFAST-HMQC. Le spectre obtenu est présenté en figure IV.16.

En présence de RETQL (spectre bleu) les signaux de la protéine restent identiques dans leur majorité. Seul le signal correspondant à l'isoleucine 120 tend à disparaître au profit du signal de la lysine 123.

Ensuite nous procédons à l'échange de ligands comme expliqué figure IV.8 pour mettre en interaction avec PDZ2/6 le peptide R16L. Le spectre méthyl-SOFAST-HMQC est présenté en figure IV.17.

Sur cette figure sont superposés les spectres 2D ^1H - ^{13}C méthyl-SOFAST-HMQC du PDZ2/6 greffé sur NiNTA en rose, et le spectre du PDZ2/6 en interaction avec le peptide R16L de couleur rose. Ici il y a beaucoup plus de différences sur les spectres qu'avec le précédent peptide. De nombreux signaux ont disparu (isoleucine 120, alanine 119, leucine 121 proton β , lysine 123...) signe d'une interaction de ce peptide avec la partie visible du PDZ2/6.

Après un nouvel échange de ligand, le peptide le plus affiné est mis en contact de PDZ2/6. Le spectre méthyl-SOFAST-HMQC est de nouveau enregistré avec les mêmes paramètres, il est présenté en figure IV.18.

Le spectre de la protéine seule est de couleur rose, tandis que celui de la protéine en présence de R16LV est représenté en bleu. Ici aussi de nombreux changements sont à noter sur le spectre RMN de la protéine. La majorité des signaux ont subi un changement (apparition, disparition, décalage du déplacement chimique). Nous observons un net effet de ce peptide sur le PDZ2/6. L'interaction a bien lieu entre R16LV et PDZ2/6.

Le spectre de PDZ2/6 avec le peptide témoin est présenté en annexe J.2. Ce spectre nous montre qu'aucune modification spectrale n'est observée avec un peptide

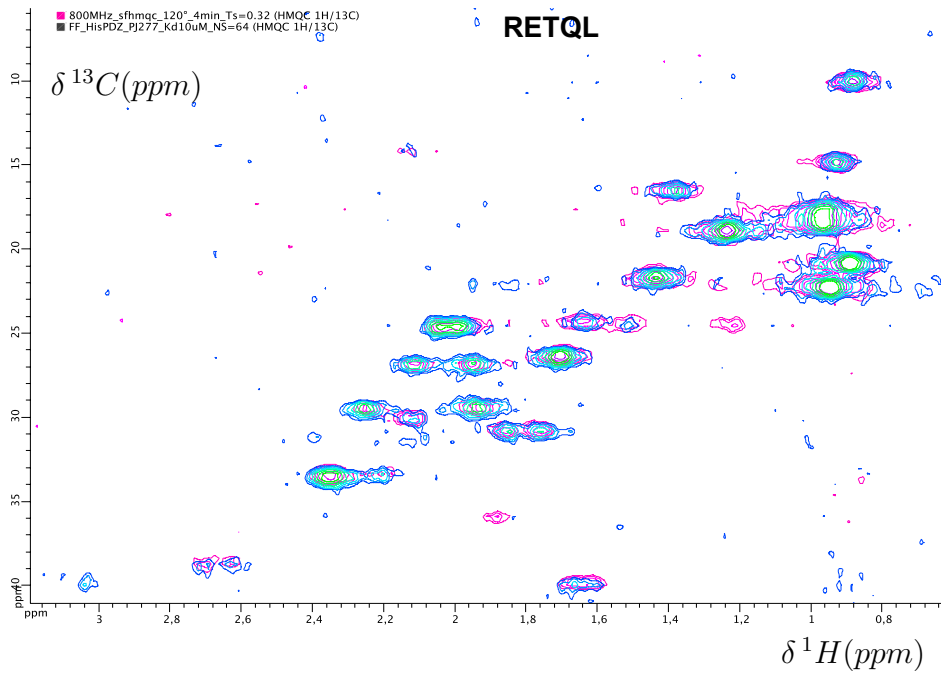


FIGURE IV.16 – Spectres 2D ^1H - ^{13}C méthyl-SOFAST-HMQC du PDZ2/6 greffé sur Fast Flow puis en interactions avec le peptide RETQL. Le spectre rose représente la protéine PDZ2/6 seule sur phase, et le spectre bleu celui de la protéine en présence du peptide. $\alpha=120^\circ$, $\text{NS}=64$, $T_{\text{scan}}=185$ msec, $[\text{PDZ2/6}]=230 \mu\text{M}$, $[\text{RETQL}]=2,2$ équivalents. Temps total d'expérience de 27 minutes.

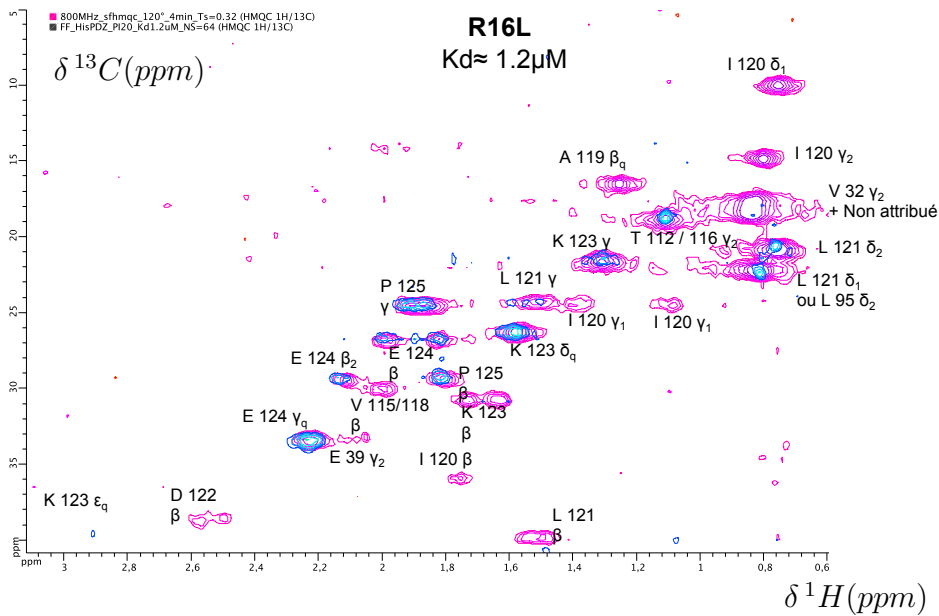


FIGURE IV.17 – Spectres 2D ^1H - ^{13}C méthyl-SOFAST-HMQC du PDZ2/6 greffé sur Fast Flow puis en interactions avec le peptide R16L. Le spectre rose représente la protéine PDZ2/6 seule sur phase, et le spectre bleu celui de la protéine en présence du peptide. $\alpha=120^\circ$, $\text{NS}=64$, $T_{\text{scan}}=185$ msec, $[\text{PDZ2/6}]=230 \mu\text{M}$, $[\text{R16L}]=4$ équivalents. Temps total d'expérience de 27 minutes.

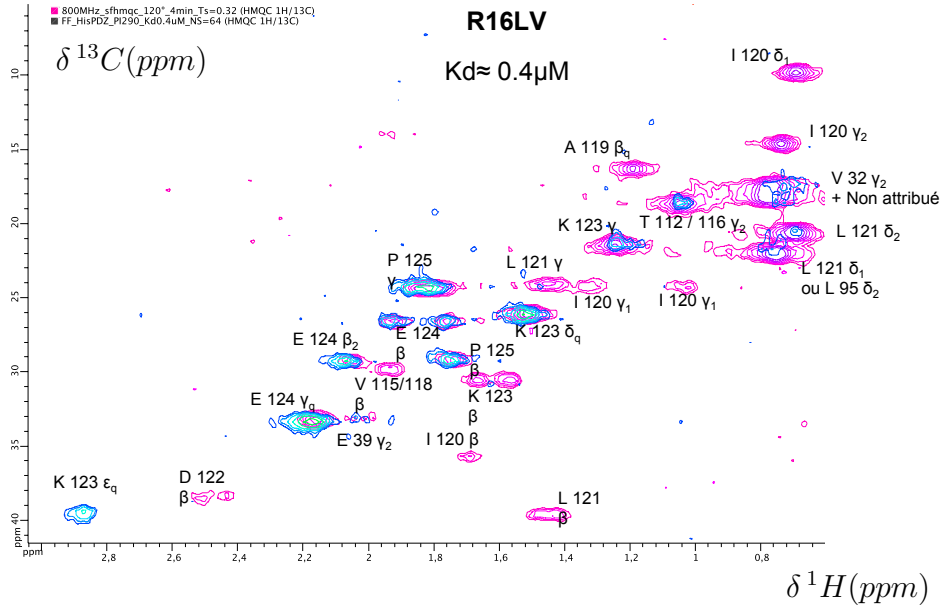


FIGURE IV.18 – Spectres 2D ^1H - ^{13}C méthyl-SOFAST-HMQC du PDZ2/6 greffé sur Fast Flow puis en interactions avec le peptide R16LV. Le spectre rose représente la protéine PDZ2/6 seule sur phase, et le spectre bleu celui de la protéine en présence du peptide. $\alpha=120^\circ$, $\text{NS}=64$, $T_{\text{scan}}=185$ msec, $[\text{PDZ2/6}]=230 \mu\text{M}$, $[\text{R16LV}]=4,6$ équivalents. Temps total d'expérience de 27 minutes.

n'offrant pas d'interaction avec PDZ2/6.

L'exploitation de ces résultats est présentée en partie IV.4, elle ne sera pas détaillée ici afin de ne pas faire doublon.

Concernant la protéine HSP90, son optimisation sur le 400 MHz a été montrée en annexe J.3. Cette protéine est étudiée elle aussi sur les deux phases au nickel, Fast Flow et NiNTA. Le spectre méthyl-SOFAST-HMQC de chacun est regroupé en figure IV.19. L'expérience a porté sur deux échantillons de même concentration en protéine, $[\text{HSP90}]=700 \mu\text{M}$. Les conditions de la méthyl-SOFAST-HMQC sont les suivantes :

greffage NiNTA : $\alpha=120^\circ$, $\text{NS}=512$, $T_{\text{scan}}=0,25$ sec, nombre de points dans les dimensions F1 :128 points et F2 : 256 points.

greffage Fast Flow : $\alpha=120^\circ$, $\text{NS}=1024$, $T_{\text{scan}}=0,27$ sec, nombre de points dans les dimensions F1 :256 points et F2 :512 points. Le spectre de la protéine HSP90 est obtenu après 4 heures d'acquisition avec un échantillon en abondance naturelle. Ce résultat est remarquable pour une protéine sans marquage isotopique sur un spectromètre 400 MHz.

Curieusement, la protéine HSP90 semble plus difficile à observer par HR-MAS lorsqu'elle est greffée sur la résine Fast Flow. Le spectre 2D ^1H - ^{13}C méthyl-SOFAST-HMQC de HSP90 greffé sur Fast Flow est bien plus mauvais après quasiment 22 heures d'acquisition, contre seulement 4 heures pour le spectre de la même protéine greffée sur NiNTA. Or la protéine est correctement fixée sur la résine puisque les spectres 1D ^1H réalisés sur les deux phases sont sensiblement identiques,

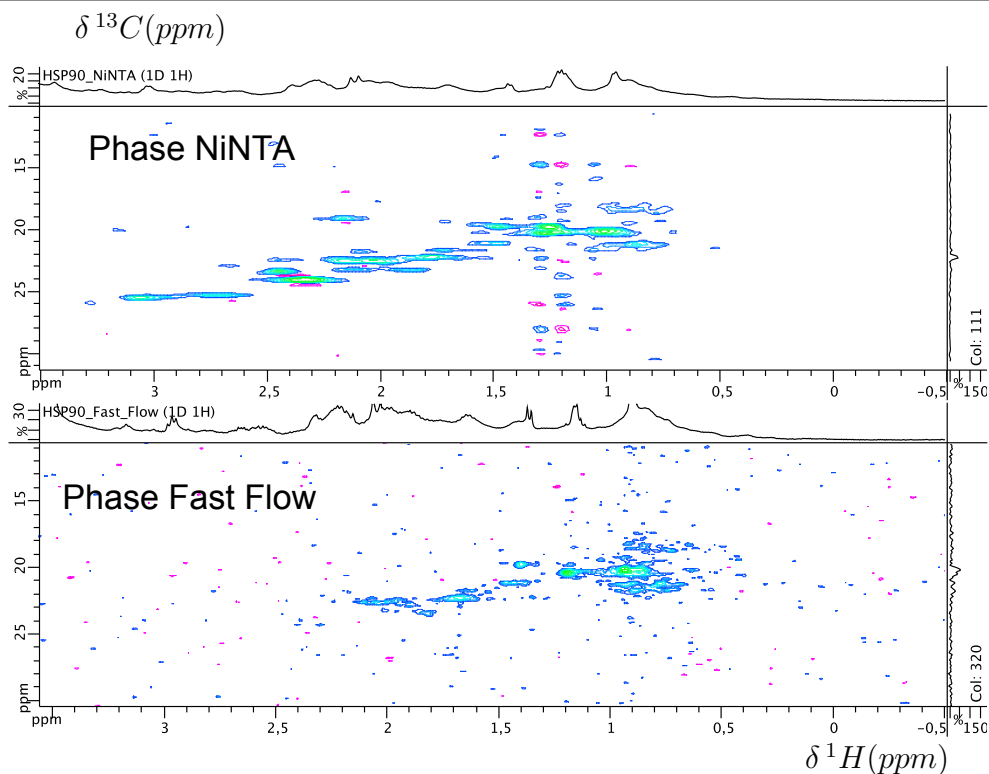


FIGURE IV.19 – Comparaison des phases NiNTA et Fast Flow avec HSP90 à 400 MHz, en abondance naturelle. Haut : Spectre 2D ^1H - ^{13}C méthyl-SOFAST-HMQC de HSP90 greffé sur NiNTA avec un temps d'acquisition de 4 heures. Bas : Spectre 2D ^1H - ^{13}C méthyl-SOFAST-HMQC de HSP90 greffé sur Fast Flow avec un temps d'acquisition de 21 heures et 21 minutes.

voir figure IV.20.

Il n'est pas impossible que la phase Fast Flow adsorbe davantage la protéine HSP90 à sa surface, lui laissant un degré de liberté réduit par comparaison à la phase NiNTA. Ainsi, la protéine devenant moins mobile et plus proche de la phase, le signal RMN s'élargit et devient difficile à détecter lors d'acquisitions 2D ^1H - ^{13}C . La protéine HSP90 greffée sur Fast Flow retourne un spectre vide lorsqu'elle est analysée sur le 800 MHz.

Malheureusement pour nous les expériences d'interaction de HSP90 sur le 800 MHz n'ont pas apporté les résultats escomptés. La protéine s'est dégradée lors des acquisitions, aucun signal RMN n'a pu être détecté pour les expériences à deux dimensions. Seule une méthyl-SOFAST-HMQC a pu être enregistrée sur ce spectromètre, mais elle ne nous apporte pas assez d'informations, le spectre est présenté en figure IV.21.

IV.3.4 Comparaison 400 MHz - 800 MHz

Ayant utilisé deux spectromètres de champs différents, il est intéressant de faire le comparatif pour un même échantillon. Le même rotor de PDZ2/6 greffé sur NiNTA est utilisé pour l'enregistrement d'une méthyl-SOFAST-HMQC. L'angle de Ernst α est placé à 120° , le taux de répétition est de $T_{scan}=0,3\text{sec}$, la quantité de PDZ2/6 est de $370\mu\text{g}$. Nous comparons deux spectres réalisés à 400 MHz et

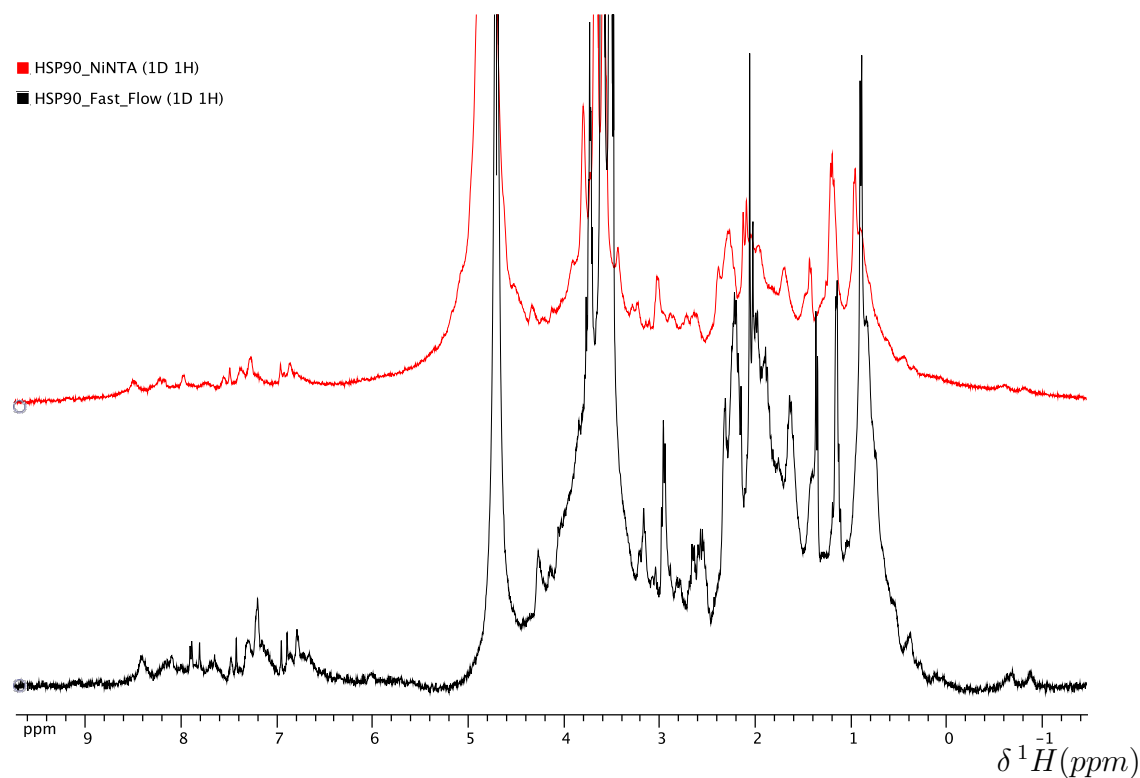


FIGURE IV.20 – Spectres 1D proton de la protéine HSP90 greffée sur NiNTA, courbe rouge, et greffée sur résine Fast Flow, courbe noire. Les deux spectres sont enregistrés dans les mêmes conditions, NS=64, [HSP90]=700 μ M.

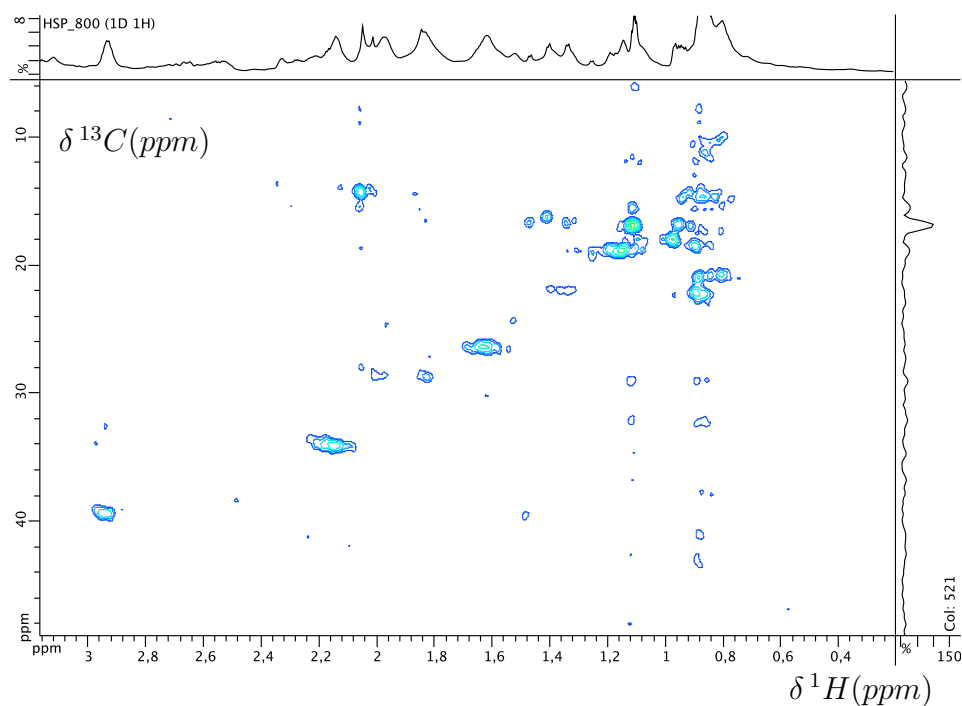


FIGURE IV.21 – Spectre 2D ^1H - ^{13}C méthyl-SOFAST-HMQC de HSP90 greffé sur NiNTA réalisé à 800 MHz. [HSP90]=700 μ M, $\alpha=120^\circ$, NS=296, $T_{scan}=0,18$ sec, temps total d'acquisition de 4 heures.

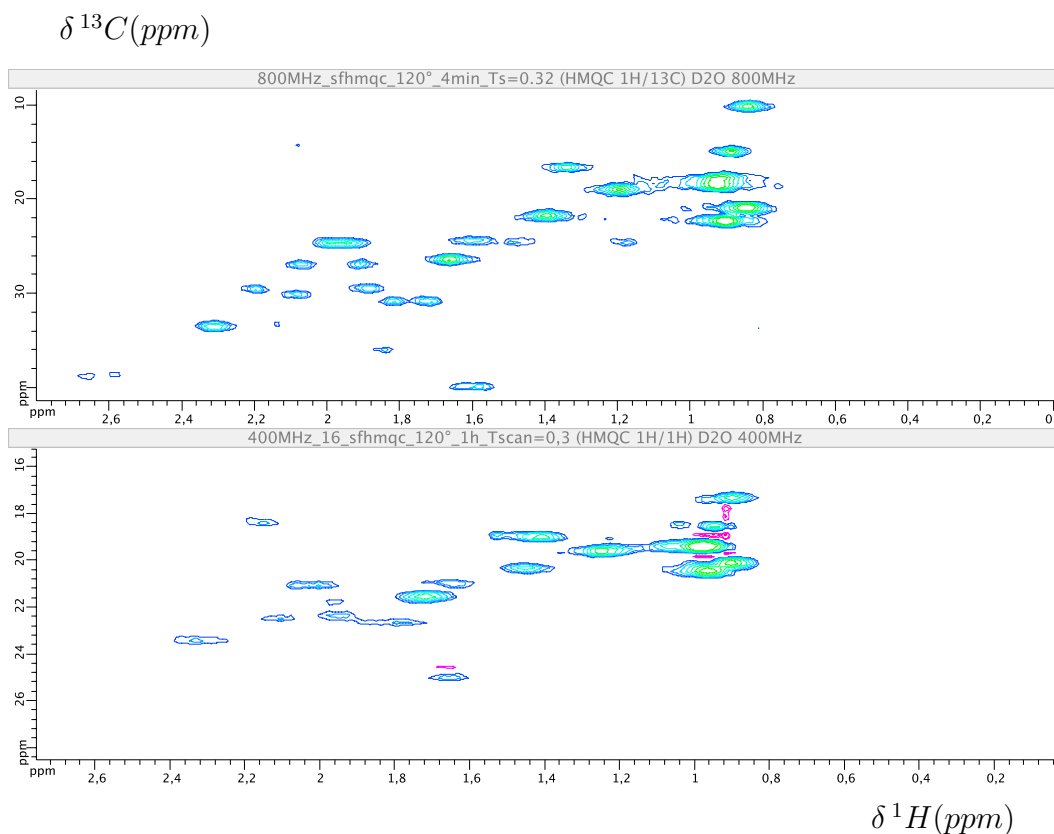


FIGURE IV.22 – Comparaison d’expériences à deux champs magnétiques différents. Haut : Spectre 2D 1H - ^{13}C méthyl-SOFAST-HMQC du PDZ2/6 greffé sur NiNTA à **800 MHz** avec un temps d’acquisition de 4 minutes. Bas : Spectre 2D 1H - ^{13}C méthyl-SOFAST-HMQC du PDZ2/6 greffé sur NiNTA à **400 MHz** avec un temps d’acquisition de 60 minutes.

à 800 MHz avec un rapport signal sur bruit équivalent (au centre de la fenêtre spectrale) pour les deux expériences. La comparaison est présentée en figure IV.22.

La sensibilité d’un spectromètre est due au moment magnétique de la matière, au flux magnétique dans le système de détection. La sensibilité est aussi liée à la quantité de population dans le niveau d’énergie $+\frac{1}{2}$ moins celle dans le niveau $-\frac{1}{2}$. Soit à la différence de population entre les deux niveaux. Or cette différence est plus importante dans un spectromètre de plus haut champ. De plus, les photons de plus haute énergie sont plus faciles à détecter. Ainsi, la sensibilité augmente comme le carré du champ magnétique. Nous avons un facteur 2 entre les deux champs magnétiques étudiés et nous attendons donc un gain de 4 pour la sensibilité. D’autre part, lors d’une accumulation, le rapport signal sur bruit d’une expérience évolue comme la racine carrée du nombre de scan, et donc du temps total d’acquisition. Dans le cas présent, le rapport des temps d’acquisition est de $\sqrt{(60/4)} = 3.87$. Comme les deux expériences présentent le même rapport signal sur bruit, on peut donc estimer le gain en sensibilité en passant de 400 à 800 MHz à 3.87, qui est très proche de la valeur théorique.

IV.4 Publication dans J. Pharm. Biomed. Anal.

Ces travaux ont fait l'objet d'une publication récente au sein de la revue *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*.

J.M.P. Viéville et al. / Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 89 (2014) 18–23.

L'article est présenté ci-après.



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jpba

Short communication

A new NMR technique to probe protein–ligand interaction

J.M.P. Viéville^{a,b}, S. Charbonnier^c, P. Eberling^a, J.-P. Starck^b, M.-A. Delsuc^{a,b,*}^a IGBMC, CNRS UMR 7104, 1 rue Laurent Fries BP10142, 67404 Illkirch, France^b NMRTEC, 850 Boulevard S. Brant, Bioparc B, 67400 Illkirch, France^c IREBS, UMR-7242, Oncoprotein Team, ESBS, 300 Boulevard S. Brant, BP 10413, 67412 Illkirch, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 11 September 2013

Received in revised form 14 October 2013

Accepted 16 October 2013

Available online 30 October 2013

Keywords:

Protein–ligand interaction

HR-MAS NMR

Grafted protein

SOFAST HMQC

MAG1 PDZ2/6

ABSTRACT

Non covalent grafting of proteins on affinity phases is a very common approach for isolation, purification and re-concentration of tagged proteins. Many biophysical studies are conducted on these grafted proteins (surface plasmon resonance, quartz crystal microbalance, etc.) showing that the integrity and function of the protein is usually maintained. However, NMR studies of such samples were not undertaken so far, due to the broadening observed on this kind of heterogeneous samples.

We present here the use of the HR-MAS technology to obtain 2D NMR spectra of the MAG1-PDZ2/6 protein domain, ¹³C-labeled, tagged with a His-tag and grafted on a Nickel affinity resin. We optimized the ¹³C Methyl SOFAST HMQC experiment allowing important gains in terms of signal-to-noise. The gain comes from the gathering of proton magnetization from the resin material to the protein under study.

Several methyl signals from the unstructured C-terminal tail, which is involved in the binding of the PDZ domain to C-terminal peptides of its partners, were observed and measured. The interaction of the bound PDZ domain with cognate peptides was monitored using <500 μg of protein sample. A response proportional to the peptide K_D is obtained, indicating that the method can be used to rapidly and efficiently monitor protein–ligand interactions.

© 2013 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

NMR is a powerful and reliable method for studying in solution interactions of proteins with small molecules [1]. Typical work concentrations allow measurement of binding events in the micro-molar affinity range. Spectral modifications of the ligand and protein spectra provide information on the specificity, the strength and eventually the geometry of the interaction. For these reasons NMR is an important tool in the drug discovery pipeline [2,3], in particular for Fragment-Based Drug Discovery (FBDD) [4]. A detailed study of the binding process requires the observation of the protein spectra, which can only be obtained on protein isotopically labeled with NMR-active isotopes (¹³C or ¹⁵N). This labeling increases considerably both the operating and financial expenses of the protein preparation.

In order to increase the throughput and the protein concentration while minimizing the absolute protein quantity, it is a considerable advantage to work with proteins immobilized on a solid phase. This approach has two main benefits: it prevents non-specific protein aggregation, even at high concentrations, and allows the successive tests of different potential ligand binders with

the same protein sample. Unfortunately, the use of heterogeneous samples creates additional difficulties for NMR spectroscopy. The variations of the magnetic susceptibility between the solution and the solid phase generate magnetic field inhomogeneities leading to considerable broadening of the NMR signal, thus hampering completely the analysis.

Several techniques have already been proposed to circumvent this difficulty. The TINS (Target Immobilized NMR Screening) approach proposed by G. Siegal and co-workers [5–7] consists in working with a solid phase (agarose or sepharose® resin), carefully chosen so that the spectral broadening is minimized. Alternatively, the S. Viel group [8] proposed to do the analysis in a HR-MAS (High Resolution Magic Angle Spinning) NMR cell to circumvent the broadening effect, with the additional advantage of increased sensitivity. However, in both cases, only the ligand is observed, and the protein signal is not detected.

HR-MAS is a technique somewhat intermediate between liquid state and solid state spectroscopy, which permits to work on heterogeneous samples. In this technique, the sample is rotated in the main magnetic field at an angle $\theta_0 = 54.7^\circ$. This “magic” angle is a zero of the second Legendre polynomial $P_2(\cos \theta) = (3 \cos^2 \theta - 1)$ which describes rank-2 tensor interactions. These interactions describe many NMR phenomena such as dipolar interaction or chemical shift anisotropy (CSA), but also the spectral broadening due to magnetic susceptibility inhomogeneity. They are naturally zeroed in liquids by molecular motion of the measured entity in

* Corresponding author at: IGBMC, CNRS UMR 7104, 1 rue Laurent Fries BP10142, 67404 Illkirch, France. Tel.: +33 3 68 85 46 88.

E-mail addresses: delsuc@igbmc.fr, madelsuc@unistra.fr (M.-A. Delsuc).

the suspension, but are persistent in solid state, or in homogeneous media where the motions are reduced.

Rotating the sample at a moderate speed (a few kHz) zeroes efficiently the effects of the weakest interactions (magnetic susceptibility inhomogeneity) but leaves unchanged the interactions at higher energy. As a consequence, in a heterogeneous sample, the solid phase is barely visible due to a very broad spectrum dominated with dipolar and CSA interactions, while the liquid phase, as well as the mobile regions grafted to the solid phase, present narrow lines similar to the ones observed in a homogeneous liquid phase. This technique has been widely used in solid phase chemistry [9], food industry [10], as well as tissues and metabolites analyses [11], and in general in the study of inhomogeneous samples.

In the current work we present a new approach to protein–ligand interaction study, based on the HR-MAS technique. Using this technique we investigate the possibility to record partial 2D HSQC NMR spectra of a protein grafted on a solid matrix, such as affinity resin beads. We take advantage of the common use of purification tags on recombinant protein samples for immobilizing the tagged protein. Optimized NMR pulse sequences such as Methyl-SOFAST-HMQC [12] is used to enhance considerably spectral quality. We show that spectra thus obtained allow the study of small amounts of proteins even at magnetic field as low as 400 MHz.

Production of recombinant proteins bearing a N- or C-terminal affinity tag speeds up protein purification by the use of affinity purification resins. Large protein fusion tags provide protein stabilization and high degrees of purity in single step purification procedures, however they require to be cleaved-off and separated from the protein of interest for NMR studies. The polyhistidine tag (His-tag) is small and mostly disordered in solvent and can therefore be left on the protein for biophysical studies [13]. The use of His-tagged proteins, along with Ion Mediated Affinity Chromatography (IMAC) resins, designed to bind the tagged protein is thus a natural choice for this work.

Using this method, we present here the interaction of the second PDZ domain of MAGI-1 (MAGI-1 PDZ2/6) with peptides derived from the C-terminal sequence of the high-risk mucosal E6 Onco-protein of the Human Papillomavirus type 16 (hrmHPV16 E6). The MAGI-1 protein is implicated into formation of cell-junctions in epithelial cells and bears six PDZ domains: PDZ1 to PDZ6 [14] (sometimes labeled PDZ0–PDZ5 [15]).

PDZ domains are protein interaction domains that were initially identified as homologous sequences in various signaling proteins [16,17] and are commonly involved in the regulation of cellular polarity and adhesion as well as in cellular signaling and sub-cellular transport [18,19]. PDZ domains usually bear about 90 amino acids and form a well defined conserved globular domain consisting of a β -barrel formed by 6 β -strands, which is capped by two α -helices [20]. Between the second β -strand and the second α -helix a conserved binding groove is located, which recognizes short C-terminal linear motifs bearing a free carboxylic acid group [21]. PDZ–peptide interaction is therefore a convenient model system for structural biology, since peptides can be produced synthetically at competitive costs and PDZ domains are small and easy to produce and to purify, which make them ideal for NMR studies.

2. Material and methods

Samples of ^{13}C labeled His-PDZ2/6 were expressed from pETM-10 *E. coli* vector using BL21 in isotopically labeled media and purified by IMAC followed by ultracentrifugation and Size Exclusion Chromatography on a Superdex HiLoad 16/60 75 pg column (see Supplementary materials). The 6-His-PDZ2/6 solutions were prepared in 20 mM phosphate buffer (pH 6.8) with 200 mM NaCl and

2 mM DTT with protein concentrations from 90 μM to 300 μM . Two different resins were studied: the Ni-NTA (Nickel NitriloTriAcetic acid; Qiagen GmbH, Hilden, Germany) and the Nickel Fast-Flow (GE Healthcare Life Sciences GmbH, Velizy, France). Ni-NTA is made of Agarose, the binding capacity is around 50 mg per ml of protein and is designed for batch purification. Fast Flow is made of Sepharose[®], the binding capacity is around 40 mg per ml and is designed for crude samples with little nickel leakage. Pore size of both resins is up to 100 Å.

In the case of grafted samples, all concentrations are expressed as the ratio of total amount of material in the rotor vs. the rotor volume, regardless of the phase excluded volume which is unknown. Such values will be called equivalent concentrations. To verify the amount of bound protein, the protein concentration in the supernatant after the binding step (Fig. 1, step 1), was quantified by liquid-state NMR using the PULCON procedure [22] with a 130 μM sample of lysozyme as reference.

All NMR experiments were run from samples prepared as described in Fig. 1. 50 μl rotors were prepared with 200 μg (11 nmol) of protein corresponding to a 230 μM equivalent concentration except for stability and SOFAST optimization samples which were prepared at 500 μM equivalent concentration (440 μg , 25 nmol). These equivalent concentrations are higher than the starting solutions, due to the concentrating action of the affinity resin.

Assignment of His-PDZ2/6 was done by spectral superimposition with a previously assigned liquid NMR spectrum [23].

Peptide synthesis was performed on a 433A Peptide Synthesizer (ABI) using Fmoc chemistry. Crude peptides were purified by reverse phase HPLC on a 250 mm \times 21.2 mm Luna C18(2) 100 Å, 5 μM column from Phenomenex, and controlled by Mass Spectrometry (ESI/TOF microTOF II Bruker). Ligand exchange protocol was performed as described in Fig. 1, step 3, sample was washed in a buffer volume of 100 ml. Beads were separated by centrifugation and inserted back in the rotor, and the next peptide was introduced as presented in Fig. 1, step 2.

HR-MAS experiments were carried out on two spectrometers: Bruker AV 400 MHz (NMRTEC, Illkirch) and Bruker AVIII 800 MHz (CRMN, Lyon), both equipped with standard HR-MAS reverse probes. 90° proton pulse was 11.3 μs at 18 W on the 800 MHz spectrometer, and 8.50 μs at 15 W on the 400 MHz spectrometer. All experiments were acquired at 298 K. Data were processed with the NMRnotebook software (NMRTEC, Illkirch), using the standard processing. Fourier transform of 2D ^1H - ^{13}C Methyl-SOFAST-HMQC spectra was applied with cosine bell apodisation and zerofilling on both axes. No baseline correction was applied. PULCON NMR experiments were carried out on a 700 MHz spectrometer equipped with a TCI Cryoprobe (IGBMC, Illkirch).

Concerning the Methyl-SOFAST-HMQC experiment optimization at 800 MHz, the proton PC9 pulse [24] was set at a 3130 μs duration, with either 90° or 120° flip angle. Band selective ^1H pulses were centered at 1.77 ppm covering a bandwidth of 3 ppm. A RSNOB refocusing pulse was used, set at 972 μs for a spectral range of 3 ppm. FID acquisition time was 80 ms, for 64 increments. In order to vary the repetition rate, the relaxation delay was changed from 4.2 ms up to 900 ms, and the number of scans from 40 to 4 and accordingly, so that the total experimental time remained constant at 8 min 36 s. SNR ratio were extracted from 2D spectra obtained with the 90° pulse. SNRs were computed as the average ratio of I120 γ_2 , I120 δ_1 , L121 δ_2 , K123 δ_q and E124 γ_q peak intensities to the noise, measured in the 0.2–1 ppm (^1H), 10–50 ppm (^{13}C) window.

Each interactions experiments were measured with 64 scans, 64 increments and a repetition rate of 0.185 ms for a total experimental time of 27 min.

The Methyl-SOFAST-HMQC experiment optimization at 400 MHz was equivalent to the 800 MHz optimization, with a

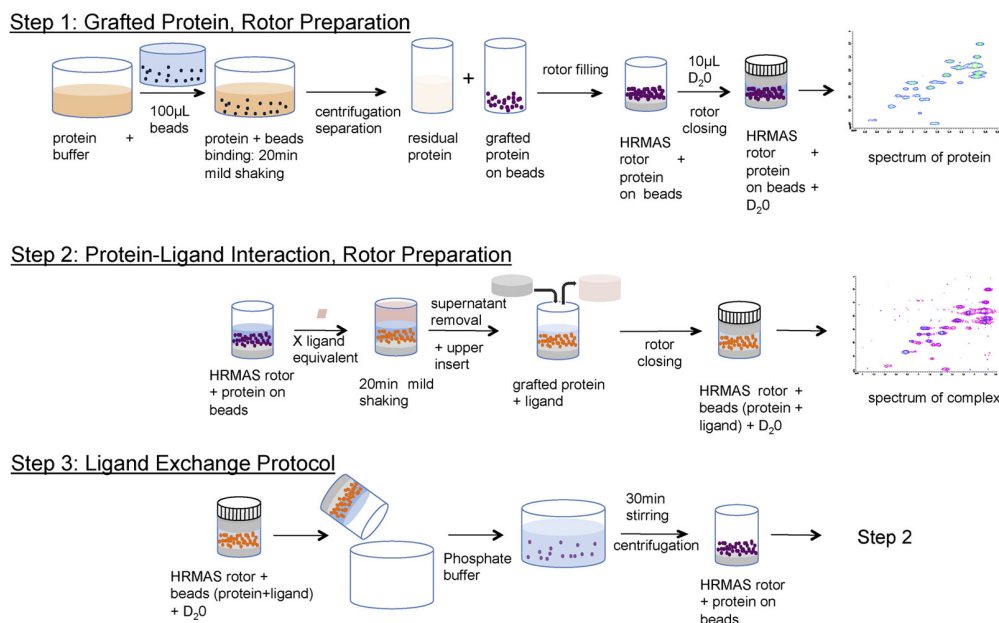


Fig. 1. Sample preparation: Step 1, 140–500 μL of protein sample (90–300 μM) is mixed with a suspension of affinity resin beads. Sample is mildly shaken for 20 min. Beads are separated by centrifugation and the residual solution of protein is quantified to monitor the amount of protein immobilized on the affinity resin. The rotor is filled with the protein saturated affinity beads and 10 μL of deuterated water is added. Step 2, 10–50 μL of peptide solution is directly added in the rotor. Sample is mildly shaken and the upper insert of the rotor is used to remove the additional volume from the rotor. Step 3, In order to exchange the ligand, the sample is removed from the rotor and washed in a large volume of buffer. Beads are separated by centrifugation and introduced in the rotor with 10 μL of deuterated water.

constant experimental time of 17 min and 30 s. The proton flip angle PC9 pulse was set at 90° and 120° for a duration of 4695 μs. Band selective ¹H pulses were centered at 1.5 ppm covering a bandwidth of 4 ppm. The Reburp refocusing pulse was used, set at 3634 μs for a spectral range of 4 ppm. The number of scans varied between 8 and 64 and the relaxation delay from 1000 ms up to 36 ms, with an acquisition time of 80 ms. 400 MHz spectra are presented in Supplementary materials.

3. Results and discussion

The MAGI-1 PDZ2/6 domain has been produced as a fusion protein with an N-terminal 6-His tag used to immobilize it onto nickel loaded resins. The NMR structure of the free MAGI-1 PDZ2/6 domain as well as its NMR and crystal structures when bound to a C-terminal peptide from hrmHPV16 E6 are known and the ¹⁵N and ¹³C assignments are available [23]. Its sequence is detailed in insert of Fig. 2.

Here, we monitor the interaction of the PDZ domain with four peptides chosen in accordance with previous studies [25–27]. Two 11 residues and one 5 residues peptides with various K_d values were chosen. The smaller one, RETQL with a K_d around 10 μM shows the weakest affinity. The 11 residues RSSRTRRETQL with a K_d around 1.2 μM is named here R16L. The second 11 residues peptide is a modification of R16L by mutating the final lysine into a valine and named here R16LV. It is known as a good ligand of PDZ2/6 with a K_d ≈ 0.4 μM. Finally, the peptide of sequence WGSNSGNGNS, for which no interaction is referenced [27], was used as a control.

The details of the procedure for preparing the protein sample are described in Fig. 1. The purified protein is bound to the resin in batch and mildly shaken for a few minutes to ensure a maximal binding. The sample is then centrifuged to recover the resin beads with minimum solvent and introduced in the HR-MAS rotor. By measuring the protein concentration of the residual protein solution, we can estimate the amount of grafted protein. Interaction studies can be directly performed in the rotor as described in Step

2 of Fig. 1. However, a ligand exchange cannot be performed in a standard rotor, so external washing of the protein has to be performed. It is important that the volume of the washing buffer is sufficient to allow the release of the ligand from the target protein. This is insured if the final concentration of the ligand in the washing solution is significantly lower than the K_d of the ligand with the protein. As the affinity of the protein for the resin is usually much stronger, the protein remains bound, and this can easily be checked on the intensity of the largest protein peaks in the NMR spectrum.

The two different resins Nickel NitroTriAcetic acid and Nickel Fast-Flow were chosen for their quality differences in nickel leakage behavior, pore size and binding capacity. Amount of grafted protein was quantified by NMR, and both phases were found to be equivalent in loading. Both resins were loaded with the same amount of His-PDZ2/6.

The 2D ¹H–¹³C Methyl-SOFAST-HMQC spectrum of His-PDZ2/6 grafted on Fast Flow beads is presented in Fig. 2 (pink spectrum). The observed lines are sharp and intense. The HR-MAS spectrum of the protein presents well resolved peaks, but is lacking many features observed in the liquid state spectrum of the same sample (see Supplementary materials). Ten amino acids were detected and assigned, and are highlighted in Fig. 2A. From the assignment, it could be determined that mostly the C-terminus is the observable part of the protein. This corresponds to a mobile and partially disordered region of the protein [28]. It is probable that due to the short linker between the His-tag and the structured domain of His-PDZ2/6, this domain is adsorbed onto the surface of the resin, and therefore is not detectable by HR-MAS NMR because of a reduced mobility. In contrast, the C-terminus tail remains free in solution and shows enough internal mobility to produce narrow signals.

Being able to record easily NMR spectra of grafted proteins brings many benefits. The sample can be washed several times without any release of the protein. In our case, the washing step has no impact on the quality of the protein sample (data not shown). As a result, the sample could be reused for additional experiments, which is a plus in the context of ligand screening.

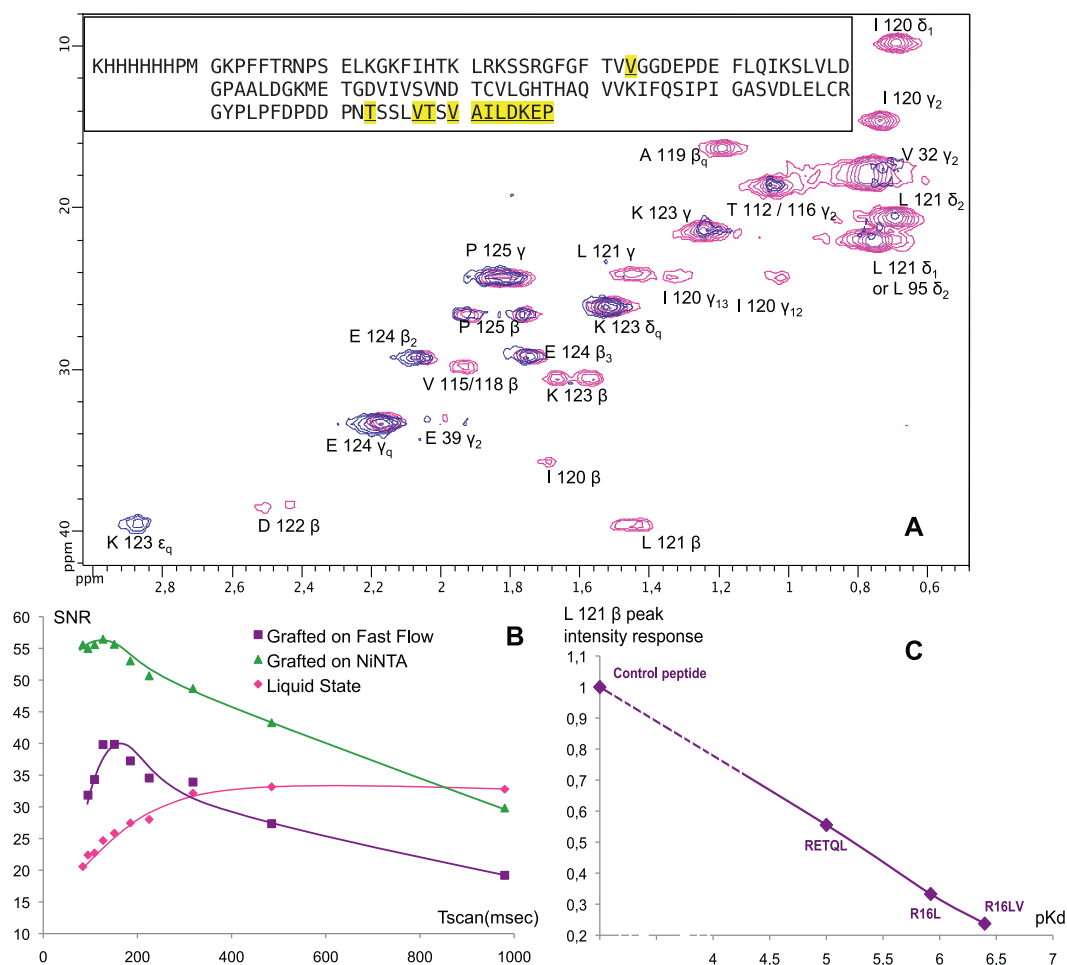


Fig. 2. (A) 800 MHz 2D ^1H - ^{13}C Methyl-SOFAST-HMQC spectrum of His-PDZ2/6 on Nickel Fast Flow beads. The PDZ amino acid sequence is shown in the insert and residues visible in the spectrum are highlighted. Pink spectrum corresponds to the grafted His-PDZ alone, blue spectrum is obtained after adding the R16LV peptide (see text). (B) SNR observed when varying the repetition time (T_{scan}) of the Methyl-SOFAST-HMQC experiment, obtained with PC9 set at 90° and a constant total experimental time of 8 min 36 s; His-PDZ 175 μM in liquid solution (pink diamonds), 500 μM on Fast Flow beads (purple squares), and 500 μM on NiNTA beads (green triangles). (C) Relative intensity of Leucine 121 signal as a function of the pK_a of the tested peptides (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

Solutions at high protein concentrations are not always easy to handle, due to the risk of protein precipitation. It is known that grafting prevents aggregation, protein concentrations can easily be brought to high values, and increase the stability of the protein. An example of the sample stability is shown in Supplementary materials with a sample of His-PDZ2/6 stored at 4°C on NiNTA beads for 106 days and showing no spectral variation.

The Methyl-SOFAST-HMQC experiment increases the sensitivity of ^1H - ^{13}C correlation experiments (HSQC) by the conjunction of a carefully crafted excitation pulse that acts only on the observed signals and of an optimized recycle delay [29,30]. In this sequence band-selective ^1H pulses are applied to the methyl groups. The band-selective ^1H pulses reduce the effective spin lattice relaxation times of the ^1H spins of methyl groups by magnetization transfer from the many non-perturbed ^1H spins. Thus, methyl magnetization recovers rapidly by spin diffusion from other protons groups such as aromatics or water protons. This approach is well proven in liquid-state NMR with homogeneous samples, but to our knowledge, it has not been described in the literature regarding heterogeneous samples.

Depending on the structure and dynamic of the sample, the Methyl-SOFAST-HMQC has to be optimized as follows. The

methyl-selective pulses are first selected and optimized. Then, the number of scans and relaxation delay, are varied conjointly at constant experimental time, in order to maximize the signal-to-noise ratio (SNR), see Fig. 2B.

The liquid state experiment does not display any increase of the SNR for short repetition rates. This is in agreement with the C-terminus of PDZ2/6 being non-structured and far from the core of the protein, thus unable to exploit magnetization transfer from the other protons. In contrast, experiments performed in the presence of resin, present a net increase in SNR for short repetition rate, with an optimum value located around 150 ms. It can also be observed that both tested phases present a different behavior, indicating a substrate effect. Finally, the SNR observed in the liquid state experiment is globally weaker than in the heterogeneous samples.

These results indicate that the Methyl-SOFAST-HMQC experiment has the potential to bring a substantial gain in sensitivity when working with grafted samples. This comes probably from several cumulated effects. Firstly, the resin, being mostly rigid, presents very fast spin-diffusion, in a similar manner to solid state samples. This rapid spin-diffusion allows the magnetization to flow very efficiently from the resin spins to the protein ones, thus leading to the observed increase in signal. Secondly, the resin is composed

of sugar moieties, presenting proton chemical shifts distinct from the methyls on which the selective pulses are optimized, a condition required to optimize the effect of the technique. Thirdly, the dynamics of the protein itself is modified by the binding, as shown by the fact that only the mobile C-terminus is visible and the increase in line widths observed in the HSQC spectrum. This improves the magnetic contact between the observed spin and the magnetization reservoir. Finally, thanks to the protein-restricted mobility, the protons of the protein can also efficiently contribute to the magnetization transfer.

No perturbations due to the presence of nickel atoms in beads are reported here. Finally, it can be observed that both resins have very similar behaviors, except for the level of the effect, indicating that the details of the resin organization is probably not an important parameter.

Using this set-up, interaction of PDZ2/6 with various peptides was investigated. Fig. 2A compares the NMR spectra of His-PDZ2/6 on nickel beads alone (pink spectrum) and after addition of the R16LV peptide (blue spectrum). Comparing these two spectra, many peaks disappear as I120 γ ₁₂ and L121 β and some present small shifts: E125 β ₂, E124 γ _q. An additional peak appears in the spectrum, tentatively assigned to lysine K123 ϵ _q. These differences indicate an interaction between the protein and this peptide, and permits its monitoring.

The disordered C-terminal region of MAGI-1 PDZ2/6 domain is known to be involved in the interaction of the cognate peptides and to obtain a partial structure upon peptide binding [31]. This implies here a partial restriction of the dynamic of the C-terminus, and in consequence a diminution of the detectable HR-MAS signal.

Additional spectra were acquired with the other peptides during the study (see Supplementary materials) with similar results and an effect intensity modulated by the peptide K_d . NMR signals from the protein present several type of response, either insensitive to the presence of the peptide (E124, P125), or collapsing rapidly in the presence of peptides even with the weakest binders (I120 β). Most signals present an intermediate response, proportional to the K_d of the ligand (A119 β , I120 γ δ , L121 β δ , D122 β , K123 β), as shown in Fig. 2C) for the L121 β signal taken as an example. Observing a proportionality insures that a quantitative information can rapidly be obtained with this technique.

Altogether, the fact that the protein displays a sensitive and meaningful response with cognate ligands indicates that the protein is perfectly active in the medium, and that neither the binding nor the 20% added D₂O have disrupted its structure.

The position of the His-tag, as well as the length of the linker by which it is attached to the protein has an effect on the mobility of the grafted protein, and in consequence on the spectra acquired with the technique described here. In the case presented here, the observation of mobile C-terminus involved in the binding of the cognate peptides, is made possible by the N-terminus position of the His-tag with a short tag. This will have to be adapted for other biological systems, using the numerous possibilities provided by molecular biology.

4. Conclusion

We have shown that it is possible to acquire NMR spectra of mobile regions of a ¹³C-labeled protein grafted on an affinity resin, using the HR-MAS technique.

Thanks to HR-MAS probe geometry and the concentration effect of the grafting on affinity beads, high quality spectra could be obtained on small amount of protein. In addition, important gain in sensitivity is possible by using the Methyl-SOFAST-HMQC experiment, due to fast magnetization recovery and optimized repetition rates. Final resulting spectra present sensitivities at least equivalent to the one observed in liquid state NMR spectroscopy.

In this study, the spectral modifications of the MAGI-1 PDZ2/6 protein domain upon ligand binding allow an easy detection of the binding event. While only the relatively unstructured C-terminus of the protein is observed, an effect proportional to the K_d is obtained.

Grafting protein on resin beads is a way to ease sample purification and handling, to stabilize the protein, and to increase its concentration. Reuse of the same protein sample for several screening tests is then possible by simply washing the grafted resin, and presenting a new test molecule. Furthermore, it can even allow to simplify the purification steps.

The use of a solid material simplifies considerably the handling of the sample, nevertheless the protein can be considered free in the media and the interactions are liquid-like. The present approach can be applied to any type of ligands – except maybe ligand which might disrupt the protein grafting (imidazole, metal chelant, etc.).

The position of the His-tag, as well as the length of the linker by which it is attached to the protein has an effect on the mobility of the grafted protein, and in consequence on the spectra acquired with the technique described here. In the case presented here, the observation of mobile C-terminus involved in the binding of the cognate peptides, is made possible by the N-terminus position of the His-tag with a short tag. This will have to be adapted for other biological systems, using the numerous possibilities provided by molecular biology.

An assay on a grafted protein certainly presents a biased response compared to a pure solution trial, however valuable information can be obtained as is shown by the routinely used techniques such as SPR (Surface Plasmon Resonance), or QCM (Quartz Crystal Microbalance [32]). In addition to these approaches, NMR spectroscopy also provides structural and dynamic information.

Acknowledgments

This work was financially supported by the NMRTEC company, and the Association Nationale de la Recherche et de la Technologie, CIFRE number 376/2010. French TGIR, is acknowledged for access to the 800 MHz HR-MAS NMR spectrometer in CRMN Lyon. The authors thank Raphaël Recht for his help in the measurement and Prof. Bruno Kieffer and the Oncoprotein team for PDZ support and discussions.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpba.2013.10.027>.

References

- [1] M.J. Harner, A.O. Frank, S.W. Fesik, Fragment-based drug discovery using NMR spectroscopy, *J. Biomol. NMR* (2013).
- [2] M. Pellecchia, I. Bertini, D. Cowburn, C. Dalvit, E. Giralt, W. Jahnke, T.L. James, S.W. Homans, H. Kessler, C. Luchinat, B. Meyer, H. Oschkinat, J. Peng, H. Schwalbe, G. Siegal, Perspectives on NMR in drug discovery: a technique comes of age, *Nat. Rev. Drug Discov.* 7 (2008) 738–745.
- [3] J.-P. Renaud, M.-A. Delsuc, Biophysical techniques for ligand screening and drug design, *Curr. Opin. Pharmacol.* 9 (2009) 1–7.
- [4] H.L. Silvestre, T.L. Blundell, C. Abell, A. Ciulli, Integrated biophysical approach to fragment screening and validation for fragment-based lead discovery, in: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2013, pp. 1–6.
- [5] S. Vanwetswinkel, R.J. Heetebrij, J. van Duynhoven, J.G. Hollander, D.V. Filippov, P.J. Hajduk, G. Siegal, TINS, target immobilized NMR screening: an efficient and sensitive method for ligand discovery, *Chem. Biol.* 12 (2005) 207–216.
- [6] T. Marquardsen, M. Hofmann, J.G. Hollander, C.M.P. Loch, S.R. Kühne, F. Engelke, G. Siegal, Development of a dual cell, flow-injection sample holder, and NMR probe for comparative ligand-binding studies, *J. Magn. Reson.* 182 (2006) 55–65.
- [7] M. Kobayashi, K. Retra, F. Figaroa, J.G. Hollander, E. Ab, R.J. Heetebrij, H. Irth, G. Siegal, Target immobilization as a strategy for NMR-based fragment screening: comparison of TINS, STD, and SPR for fragment hit identification, *J. Biomol. Screen.* 15 (2010) 978–989.

- [8] F. Ziarelli, L. Peng, C.-C. Zhang, S. Viel, High resolution magic angle spinning NMR to investigate ligand-receptor binding events for mass-limited samples in liquids, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 59 (2012) 13–17.
- [9] J.F. Espinosa, High resolution magic angle spinning NMR applied to the analysis of organic compounds bound to solid supports, *Curr. Top. Med. Chem.* 11 (2011) 74–92.
- [10] L. Shintu, S. Caldarelli, High-resolution MAS NMR and chemometrics: characterization of the ripening of Parmigiano Reggiano cheese, *J. Agric. Food Chem.* 53 (2005) 4026–4031.
- [11] K. Elbayed, V. Berl, C. Debeuckelaere, F.-M. Moussallieh, M. Piotto, I.-J. Namer, J.-P. Lepoittevin, HR-MAS NMR spectroscopy of reconstructed human epidermis: potential for the in situ investigation of the chemical interactions between skin allergens and nucleophilic amino acids, *Chem. Res. Toxicol.* 26 (2013) 136–145.
- [12] A. Ross, M. Salzmann, H. Senn, Fast-HMQC using Ernst angle pulses: an efficient tool for screening of ligand binding to target proteins, *J. Biomol. NMR* 10 (1997) 1–8.
- [13] R. Xiao, S. Anderson, J. Aramini, R. Belote, W.A. Buchwald, C. Ciccocanti, K. Conover, J.K. Everett, K. Hamilton, Y.J. Huang, H. Janjua, M. Jiang, G.J. Kornhaber, D.Y. Lee, J.Y. Locke, L.-C. Ma, M. Maglaqui, L. Mao, S. Mitra, D. Patel, P. Rossi, S. Sahdev, S. Sharma, R. Shastry, G.V.T. Swapna, S.N. Tong, D. Wang, H. Wang, L. Zhao, G.T. Montelione, T.B. Acton, The high-throughput protein sample production platform of the Northeast Structural Genomics Consortium, *J. Struct. Biol.* 172 (2010) 21–33.
- [14] K. Luck, S. Charbonnier, G. Travé, The emerging contribution of sequence context to the specificity of protein interactions mediated by PDZ domains, *FEBS Lett.* 586 (2012) 2648–2661.
- [15] I. Dobrosotskaya, MAGI-1, a membrane-associated guanylate kinase with a unique arrangement of protein-protein interaction domains, *J. Biol. Chem.* 272 (1997) 31589–31597.
- [16] K.O. Cho, C.A. Hunt, M.B. Kennedy, The rat brain postsynaptic density fraction contains a homolog of the *Drosophila* discs-large tumor suppressor protein, *Neuron* 9 (1992) 929–942.
- [17] E. Kim, M. Niethammer, A. Rothschild, Y.N. Jan, M. Sheng, Clustering of Shaker-type K⁺ channels by interaction with a family of membrane-associated guanylate kinases, *Nature* 378 (1995) 85–88.
- [18] M.H. Roh, B. Margolis, Composition and function of PDZ protein complexes during cell polarization, *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 285 (2003) F377–87.
- [19] F. Jelen, A. Oleksy, K. Smietana, J. Otlewski, PDZ domains – common players in the cell signaling, *Acta Biochim. Pol.* 50 (2003) 985–1017.
- [20] D.A. Doyle, A. Lee, J. Lewis, E. Kim, M. Sheng, R. MacKinnon, Crystal structures of a complexed and peptide-free membrane protein-binding domain: molecular basis of peptide recognition by PDZ, *Cell* 85 (1996) 1067–1076.
- [21] Z. Songyang, Recognition of unique carboxyl-terminal motifs by distinct PDZ domains, *Science* 275 (1997) 73–77.
- [22] G. Wider, L. Dreier, Measuring protein concentrations by NMR spectroscopy, *J. Am. Chem. Soc.* 128 (2006) 2571–2576.
- [23] S. Charbonnier, M.-A. Coutouly, B. Kieffer, G. Travé, R.A. Atkinson, ¹³C ¹⁵H and ¹H resonance assignment of the PDZ1 domain of MAGI-1 using QUASI, *J. Biomol. NMR* 36 (2006) 33.
- [24] Ě. Kupče, R. Freeman, Wideband excitation with polychromatic pulses, *J. Magn. Reson. Ser. A* 108 (1994) 268–273.
- [25] S. Charbonnier, G. Stier, G. Orfanoudakis, B. Kieffer, R.A. Atkinson, G. Travé, Defining the minimal interacting regions of the tight junction protein MAGI-1 and HPV16 E6 oncoprotein for solution structure studies, *Protein Expr. Purif.* 60 (2008) 64–73.
- [26] S. Charbonnier, Y. Nominé, J. Ramírez, K. Luck, A. Chapelle, R.H. Stote, G. Travé, B. Kieffer, R.A. Atkinson, The structural and dynamic response of MAGI-1 PDZ1 with noncanonical domain boundaries to the binding of human papillomavirus E6, *J. Mol. Biol.* 406 (2011) 745–763.
- [27] K. Luck, S. Fournane, B. Kieffer, M. Masson, Y. Nominé, G. Travé, Putting into practice domain-linear motif interaction predictions for exploration of protein networks, *PLoS ONE* 6 (2011).
- [28] Y. Nominé, S. Charbonnier, L. Miguët, N. Potier, A. Van Dorsselaer, R.A. Atkinson, G. Travé, B. Kieffer, ¹H and ¹⁵N resonance assignment, secondary structure and dynamic behaviour of the C-terminal domain of human papillomavirus oncoprotein E6, *J. Biomol. NMR* 31 (2005) 129–141.
- [29] P. Schanda, Ě. Kupče, B. Brutscher, SOFAST-HMQC experiments for recording two-dimensional heteronuclear correlation spectra of proteins within a few seconds, *J. Biomol. NMR* 33 (2005) 199–211.
- [30] P. Schanda, B. Brutscher, Very fast two-dimensional NMR spectroscopy for real-time investigation of dynamic events in proteins on the time scale of seconds, *J. Am. Chem. Soc.* 127 (2005) 8014–8015.
- [31] K. Zanier, S. Charbonnier, A.O.M.O. Sidi, A.G. McEwen, M.G. Ferrario, P. Poussin-Courmontagne, V. Cura, N. Brimer, K.O. Babah, T. Ansari, I. Muller, R.H. Stote, J. Cavarelli, S. Vande Pol, G. Trave, Structural basis for hijacking of cellular LxxLL motifs by papillomavirus E6 oncoproteins, *Science* 339 (2013) 694–698.
- [32] Q. Cao, Y. Yin, L. Quan, N. Li, K. Li, F. Liu, Weak affinity ligands selection using quartz crystal microbalance biosensor: multi-hydroxyl amine ligands for protein separation, *Anal. Chim. Acta* 703 (2011) 250–256.

IV.5 Conclusion

L'analyse de protéine par RMN est très développée, de nombreuses séquences RMN sont disponibles, de nombreuses techniques permettent de déterminer la structure, la dynamique et la conformation des protéines. Malheureusement ceci ne s'applique qu'à des systèmes biologiques en solution homogène. Nous montrons ici que l'analyse de protéine sur phase greffée est réalisable à l'aide de la technologie HR-MAS. Cette technologie allie l'utilisation de séquences d'impulsion liquides, et l'application de la rotation à l'angle magique pour permettre l'étude d'échantillons hétérogènes avec et sans marquage isotopique.

Cette étude porte sur l'analyse de deux protéines : PDZ2/6 marquée ^{13}C et HSP90 produite sans marquage isotopique. Ces deux protéines sont exprimées et produites avec un tag en partie N-ter afin de les greffer sur une phase solide. Pour des raisons techniques et pratiques, notre choix se porte sur les His-tag et les colonnes au nickel. Après greffage des protéines sur la résine au nickel, nous les analysons par RMN HR-MAS. Pour la caractérisation de protéine, les expériences à deux dimensions ^1H - ^{13}C sont nécessaires. Malheureusement, les expériences classiques 2D ^1H - ^{13}C de type HSQC prennent beaucoup de temps à acquérir. C'est pourquoi nous avons choisi d'implémenter la séquence méthyl-SOFAST-HMQC à nos analyses par HR-MAS. Après avoir mis au point la séquence et avoir optimisé les paramètres, nous obtenons des premiers résultats intéressants. Il est mis en évidence un effet de la phase lors de l'utilisation de cette séquence sur des protéines greffées. L'optimisation de la séquence nous permet de créer des courbes de corrélation entre le rapport signal sur bruit (SNR) du spectre RMN et le taux de répétition de la séquence SOFAST-HMQC. Le rapport signal sur bruit obtenu pour une protéine greffée est bien meilleur en comparaison du rapport signal sur bruit d'une protéine en solution. Ceci démontre que la phase participe au retour à l'équilibre des spins excités en apportant de l'aimantation. L'utilisation de la méthyl-SOFAST-HMQC offre alors de meilleures opportunités en l'utilisant en technologie HR-MAS avec une protéine greffée.

Au travers des analyses de la protéine HSP90 nous montrons qu'il est possible désormais de travailler en abondance naturelle, sans marquage isotopique. Par ailleurs, avec une faible quantité de protéine non marquée, nous pouvons mesurer un spectre ^1H - ^{13}C des groupes méthyles avec une bonne résolution. Tout comme [Quinternet 2012] nous mesurons des cartes 2D ^1H - ^{13}C méthyl-SOFAST-HMQC mais dans un rotor HR-MAS avec une concentration moins importante en protéine ($700\ \mu\text{M}$ ici). Nos spectres sont obtenus après quatre heures d'acquisition sur le spectromètre 400 MHz avec un SNR très satisfaisant. Il sera en conséquent possible de suivre les interactions de cette protéine avec divers ligands, le tout en abondance naturelle. Ceci est la prochaine étape du projet, réitérer les expériences de mesure d'interaction sur HSP90 greffé sur phase NiNTA avec différents ligands.

Nous avons aussi mis en évidence que le choix de la phase solide était primordial. Certaines phases offrent des résultats moindres, comme le montre la Fast Flow testée ici. Malgré une bonne capacité de fixation de la protéine, cette phase n'offre pas les mêmes avantages selon la protéine étudiée. Pour l'HSP90 la phase Fast Flow ne permet pas l'observation par HR-MAS alors que l'étude est possible avec PDZ2/6.

La protéine HSP90 "disparaît" du spectre RMN lorsqu'elle est fixée sur la Fast Flow, alors qu'avec la phase NiNTA nous n'avons recensé aucun souci particulier. En comparant le rapport signal sur bruit obtenu en fonction du taux de répétition de la mesure pour la protéine PDZ2/6 greffée sur les deux phases, nous notons que la phase NiNTA offre de meilleurs SNR.

À l'aide de l'attribution de la protéine PDZ2/6, nous montrons que seule une partie de la protéine est visible ici. La partie visible de PDZ2/6 ici, est la partie C-terminale, partie non structurée et mobile de la protéine. En effet, il faut que la protéine soit suffisamment mobile pour être observée en HR-MAS.

Après avoir montré que l'étude de protéine sur phase greffée est rendue possible par HR-MAS, nous réalisons des mesures d'interaction. Les mesures d'interaction portent sur PDZ2/6 et quatre peptides. Une fois le peptide mis en interaction avec la protéine, une expérience méthyl-SOFAST-HMQC est enregistrée. Les spectres obtenus pour chaque protéine sont comparés à ceux de la protéine seule sur la phase solide. Un effet proportionnel au K_d est observé ici. Le spectre RMN varie en fonction du K_d du peptide mis en interaction, et la modification spectrale est plus visible avec le peptide de plus forte affinité.

Pour conclure, cette étude démontre l'utilité de l'analyse de protéines greffées sur phase solide par RMN HR-MAS. Cette méthode offre l'avantage considérable d'être économe en protéine, les échantillons sont réutilisables, puisque lavables sur la résine. Et la RMN offre la possibilité d'obtenir des informations structurales et dynamiques, ce qui fait de cette technique une méthode complète d'analyse de protéines greffées.

Bibliographie

- [Abelson 2003] Abelson J.N. et Simon M.I. *Methods in Enzymology*, 2003. (Cité en page 123.)
- [Amero 2009] Amero C., Schanda P., Dur  M.A., Ayala I., Marion D., Franzetti B., Brutscher B. et Boisbouvier J. *Fast two-dimensional NMR spectroscopy of high molecular weight protein assemblies*. *J Am Chem Soc*, vol. 131, no. 10, 2009. (Cité en page 131.)
- [Andrew 1958] Andrew E.R. et Newing R.A. *The Narrowing of Nuclear Magnetic Resonance Spectra by Molecular Rotation in Solids*. *Proc Phys Soc*, vol. 72, no. 6, page 959, 1958. (Cité en page 118.)
- [Buchner 1999] Buchner J. *Hsp90 & Co. – a holding for folding*. *Trends Biochem Sci*, vol. 24, no. 4, 1999. (Cité en page 128.)
- [Carvalho 2010] Carvalho L.R., Corvo M.C., Enugala R., Marques M.M.B. et Carbrita E.J. *Application of HR-MAS NMR in the solid-phase synthesis of a glycopeptide using Sieber amide resin*. *Magn. Reson. Chem.*, vol. 48, no. 4, 2010. (Cité en page 122.)
- [Chapman 1972] Chapman D., Oldfield E., Doslkocilov  D. et Schneider B. *NMR of gel and liquid crystalline phospholipids spinning at the 'magic angle'*. *FEBS Lett.*, vol. 25, no. 2, 1972. (Cité en page 122.)
- [Charbonnier 2006] Charbonnier S., Coutouly M.A., Kieffer B., Trav  G. et Atkinson R.A. *¹³C, ¹⁵N and ¹H Resonance Assignment of the PDZ1 domain of MAGI-1 using QUASI*. *J Biomol NMR*, vol. 36, no. S1, 2006. (Cité en page 134.)
- [Charbonnier 2008] Charbonnier S., Stier G., Orfanoudakis G., Kieffer B., Atkinson R.A. et Trav  G. *Defining the minimal interacting regions of the tight junction protein MAGI-1 and HPV16 E6 oncoprotein for solution structure studies*. *Protein Express Purif*, vol. 60, no. 1, 2008. (Cité en page 125.)
- [Charbonnier 2011] Charbonnier S., Nominé Y., Ramírez J., Luck K., Chapelle A., Stote R.H., Trav  G., Kieffer B. et Atkinson R.A. *The Structural and Dynamic Response of MAGI-1 PDZ1 with Noncanonical Domain Boundaries to the Binding of Human Papillomavirus E6*. *J Mol Biol*, vol. 406, 2011. (Cité en page 125.)
- [Chauton 2008] Chauton M.S. et St rseth T.R. *HR MAS NMR Spectroscopy of Marine Microalgae, Part 1 : Classification and Metabolite Composition from HR MAS ¹H NMR Spectra and Multivariate Analysis*. *Mod Magn Res*, vol. I, 2008. (Cité en page 123.)
- [Chen 2004] Chen J.H., Sambol E.B., Kennealey P.T., O'Connor R.B., DeCarolis P.L., Cory D.G. et Singer S. *Water suppression without signal loss in HR-MAS ¹H NMR of cells and tissues*. *J Magn Reson*, vol. 171, no. 1, 2004. (Cité en page 123.)
- [Chen 2006] Chen J.H., Sambol E.B., Decarolis P., O'connor R., Geha R.C., Wu Y.V. et Singer S. *High-resolution MAS NMR spectroscopy detection of the*

- spin magnetization exchange by cross-relaxation and chemical exchange in intact cell lines and human tissue specimens.* Magn. Reson. Med., vol. 55, no. 6, pages 1246–1256, 2006. (Cité en page 123.)
- [Cho 1992] Cho K.O., Hunt C.A. et Kennedy M.B. *The rat brain postsynaptic density fraction contains a homolog of the Drosophila discs-large tumor suppressor protein.* Neuron, vol. 9, no. 5, 1992. (Cité en page 124.)
- [Dobrosotskaya 1997] Dobrosotskaya I. *MAGI-1, a Membrane-associated Guanylate Kinase with a Unique Arrangement of Protein-Protein Interaction Domains.* J Biol Chem, vol. 272, no. 50, 1997. (Cité en page 125.)
- [Doskocilová 1975] Doskocilová D., Tao D.D. et Schneider B. *Effects of macroscopic spinning upon linewidth of nmr signals of liquid in magnetically inhomogeneous systems.* Czech J Phys B, vol. 25, 1975. (Cité en page 122.)
- [Doyle 1996] Doyle D.A., Lee A., Lewis J., Kim E., Sheng M. et MacKinnon R. *Crystal structures of a complexed and peptide-free membrane protein-binding domain : molecular basis of peptide recognition by PDZ.* Cell, vol. 85, no. 7, 1996. (Cité en page 124.)
- [Duchène 2010] Duchène T., Mihai C., Willem R. et Tourwé D. *Monitoring the allyl ester deprotection by HR MAS NMR in BAL-solid phase peptide synthesis.* J Pept Sci, vol. 16, no. 12, 2010. (Cité en page 122.)
- [Dutton 2014] Dutton B.L., Kitson R.R.A., Parry-Morris S., Roe S.M., Prodromou C. et Moody C.J. *Synthesis of macrolactam analogues of radicicol and their binding to heat shock protein Hsp90.* Org Biomol Chem, 2014. (Cité en page 128.)
- [Elbayed 2013] Elbayed K., Berl V., Debeuckelaere C., Moussallieh F.M., Piotto M., Namer I.J. et Lepoittevin J.P. *HR-MAS NMR Spectroscopy of Reconstructed Human Epidermis : Potential for the in Situ Investigation of the Chemical Interactions between Skin Allergens and Nucleophilic Amino Acids.* Chem. Res. Toxicol., vol. 26, no. 1, 2013. (Cité en page 123.)
- [Espinosa 2011] Espinosa J.F. *High resolution magic angle spinning NMR applied to the analysis of organic compounds bound to solid supports.* Curr Top Med Chem, vol. 11, no. 1, pages 74–92, 2011. (Cité en pages 3 et 123.)
- [Fassina 2005] Fassina G. et Miertus S. *Combinatorial Chemistry and Technologies- Methods and Applications.* CRC Press, vol. 2nd edition, 2005. (Cité en page 123.)
- [Fitch 1994] Fitch W.L., Detre G. et Holmes C.P. *High-Resolution ^1H NMR in Solid-Phase Organic Synthesis.* J Org Chem, vol. 59, pages 7955–7956, 1994. (Cité en page 122.)
- [Fournane 2010] Fournane S., Charbonnier S., Chapelle A., Kieffer B., Orfanoudakis G., Travé G., Masson M. et Nominé Y. *Surface plasmon resonance analysis of the binding of high-risk mucosal HPV E6 oncoproteins to the PDZ1 domain of the tight junction protein MAGI-1.* J. Mol. Recognit., vol. 24, no. 4, 2010. (Cité en page 125.)

- [Furrer 2001] Furrer J., Piotta M., Bourdonneau M., Limal D., Guichard G., Elbayed K., Raya J., Briand J.P. et Bianco A. *Evidence of Secondary Structure by High-Resolution Magic Angle Spinning NMR Spectroscopy of a Bioactive Peptide Bound to Different Solid Supports*. J Am Chem Soc, vol. 123, no. 18, 2001. (Cité en page 123.)
- [Hellriegel 2004] Hellriegel C., Skogsberg U., Albert K., Lämmerhofer M., Maier N.M. et Lindner W. *Characterization of a chiral stationary phase by HR-/MAS NMR spectroscopy and investigation of enantioselective interaction with chiral ligates by transferred NOE*. J Am Chem Soc, vol. 126, no. 12, 2004. (Cité en page 123.)
- [James 2006] James M.A., Lee J.H. et Klingelutz A.J. *Human Papillomavirus Type 16 E6 Activates NF- κ B, Induces cIAP-2 Expression, and Protects against Apoptosis in a PDZ Binding Motif-Dependent Manner*. J Virol, vol. 80, no. 11, 2006. (Cité en page 124.)
- [Jelen 2003] Jelen F., Oleksy A., Smietana K. et Otlewski J. *PDZ domains - common players in the cell signaling*. Acta Biochim. Pol., vol. 50, no. 4, pages 985–1017, 2003. (Cité en page 124.)
- [Joe 2008] Joe B.N., Vahidi K., Zektzer A., Chen M.H., Clifton M.S., Butler T., Keshari K., Kurhanewicz J., Coakley F. et Swanson M.G. *1H HR-MAS spectroscopy for quantitative measurement of choline concentration in amniotic fluid as a marker of fetal lung maturity : Inter- and intraobserver reproducibility study*. J. Magn. Reson. Imaging, vol. 28, no. 6, 2008. (Cité en page 123.)
- [Keifer 1996] Keifer P.A. *Influence of Resin Structure, Tether Length, and Solvent upon the High-Resolution (1H) NMR Spectra of Solid-Phase-Synthesis Resins*. J Org Chem, vol. 61, no. 5, 1996. (Cité en page 122.)
- [Kim 1995] Kim E., Niethammer M., Rothschild A., Jan Y. et Sheng M. 1995. (Cité en page 124.)
- [Kiyono 1997] Kiyono T., Hiraiwa A., Fujita M., Hayashi Y., Akiyama T. et Ishibashi M. *Binding of high-risk human papillomavirus E6 oncoproteins to the human homologue of the Drosophila discs large tumor suppressor protein*. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., vol. 94, no. 21, 1997. (Cité en page 124.)
- [Klein 1999] Klein J., Meinecke R., Mayer M. et Meyer B. *Detecting Binding Affinity to Immobilized Receptor Proteins in Compound Libraries by HR-MAS STD NMR*. J Am Chem Soc, vol. 121, no. 22, pages 5336–5337, 1999. (Cité en pages 2 et 123.)
- [Kupče 1994] Kupče Ě. et Freeman R. *Wideband Excitation with Polychromatic Pulses*. J Magn Res Ser A, vol. 108, no. 2, pages 268–273, 1994. (Cité en page 132.)
- [Li 2005] Li W., Lee R.E.B., Lee R.E. et Li J. *Methods for Acquisition and Assignment of Multidimensional High-Resolution Magic Angle Spinning NMR of Whole Cell Bacteria*. Anal. Chem., vol. 77, no. 18, 2005. (Cité en page 123.)
- [Lowe 1959] Lowe L.J. *Free induction decays of rotating solids*. Phys. Rev. Lett., vol. 2, no. 7, 1959. (Cité en page 118.)

- [Lucas 2004] Lucas L.H., Cerny M.A., Koen Y.M., Hanzlik R.P. et Larive C.K. *¹H high-resolution magic-angle spinning (HR-MAS) NMR analysis of ligand density on resins using a resin internal standard.* Anal Bioanal Chem, vol. 380, no. 4, 2004. (Cité en page 123.)
- [Lucas 2005] Lucas L.H., Wilson S.F., Lunte C.E. et Larive C.K. *Concentration Profiling in Rat Tissue by High-Resolution Magic-Angle Spinning NMR Spectroscopy : Investigation of a Model Drug.* Anal. Chem., vol. 77, no. 9, 2005. (Cité en page 123.)
- [Luck 2011] Luck K., Fournane S., Kieffer B., Masson M., Nominé Y. et Travé G. *Putting into Practice Domain-Linear Motif Interaction Predictions for Exploration of Protein Networks.* PLoS ONE, vol. 6, no. 11, 2011. (Cité en page 125.)
- [Luck 2012] Luck K., Charbonnier S. et Travé G. *The emerging contribution of sequence context to the specificity of protein interactions mediated by PDZ domains.* FEBS Lett., vol. 586, no. 17, 2012. (Cité en page 124.)
- [Luo 2011] Luo J., Pardin C., Zhu X.X. et Lubell W.D. *Preparation, characterization, and application of poly(vinyl alcohol)-graft-poly(ethylene glycol) resins : novel polymer matrices for solid-phase synthesis.* J Comb Chem, vol. 9, no. 4, 2011. (Cité en page 122.)
- [Maas 1996] Maas W.E., Laukien F.H. et Cory D.G. *Gradient, High Resolution, Magic Angle Sample Spinning NMR.* J Am Chem Soc, vol. 118, no. 51, 1996. (Cité en page 122.)
- [Martínez-Granados 2006] Martínez-Granados B., Monleon D., Martínez-Bisbal M.C., Rodrigo J.M., Olmo J.d., Lluch P., Ferrández A., Martí-Bonmatí L. et Celda B. *Metabolite identification in human liver needle biopsies by high-resolution magic angle spinning ¹H NMR spectroscopy.* NMR Biomed., vol. 19, no. 1, pages 90–100, 2006. (Cité en page 123.)
- [Marzorati 2013] Marzorati M., Bigler P., Plattner M. et Vermathen M. *Feasibility of ¹H-High Resolution-Magic Angle Spinning NMR Spectroscopy in the Analysis of Viscous Cosmetic and Pharmaceutical Formulations.* Anal. Chem., vol. 85, no. 8, 2013. (Cité en page 123.)
- [Meissner 1997] Meissner A., Bloch P., Humpfer E., Spraul M. et Sørensen O.W. *Reduction of Inhomogeneous Line Broadening in Two-Dimensional High-Resolution MAS NMR Spectra of Molecules Attached to Swelled Resins in Solid-Phase Synthesis.* J Am Chem Soc, vol. 64, page 4226, 1997. (Cité en page 122.)
- [Merrifield 1963] Merrifield R.B. *Solid Phase Peptide Synthesis. The Synthesis of a Tetrapeptide.* J Am Chem Soc, vol. 85, no. 14, 1963. (Cité en page 122.)
- [Nominé 2005] Nominé Y., Charbonnier S., Miguet L., Potier N., Van Dorsselaer A., Atkinson R.A., Travé G. et Kieffer B. *¹H and ¹⁵N resonance assignment, secondary structure and dynamic behaviour of the C-terminal domain of human papillomavirus oncoprotein E6.* J Biomol NMR, vol. 31, no. 2, 2005. (Cité en page 134.)

- [Pampel 2004] Pampel A., Zick K., Glauner H. et Engelke F. *Studying lateral diffusion in lipid bilayers by combining a magic angle spinning NMR probe with a microimaging gradient system.* J Am Chem Soc, vol. 126, no. 31, 2004. (Cité en page 123.)
- [Pearl 2006] Pearl L.H. et Prodromou C. *Structure and mechanism of the Hsp90 molecular chaperone machinery.* Annu. Rev. Biochem., vol. 75, pages 271–294, 2006. (Cité en pages 1 et 128.)
- [Polito 2008] Polito L., Colombo M., Monti D., Melato S., Caneva E. et Prosperi D. *Resolving the Structure of Ligands Bound to the Surface of Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles by High-Resolution Magic-Angle Spinning NMR Spectroscopy.* J Am Chem Soc, vol. 130, no. 38, 2008. (Cité en page 123.)
- [Quinternet 2012] Quinternet M., Starck J.P., Delsuc M.A. et Kieffer B. *Unraveling complex small-molecule binding mechanisms by using simple NMR spectroscopy.* Chem. Eur. J., vol. 18, no. 13, 2012. (Cité en pages 1, 131 et 149.)
- [Ramadhar 2008] Ramadhar T.R., Amador F., Ditty M.J.T. et Power W.P. *Inverse H-Cex situ HRMAS NMR experiments for solid-phase peptide synthesis.* Magn. Reson. Chem., vol. 46, no. 1, 2008. (Cité en page 122.)
- [Renault 2013] Renault M., Shintu L., Piotta M. et Caldarelli S. *Slow-spinning low-sideband HR-MAS NMR spectroscopy : delicate analysis of biological samples.* Sci. Rep., 2013. (Cité en page 123.)
- [Righi 2009] Righi V., Andronesi O.C., Mintzopoulos D., Black P.M. et Tzika A.A. *High-resolution magic angle spinning magnetic resonance spectroscopy detects glycine as a biomarker in brain tumors.* Int J Oncol, vol. 36, 2009. (Cité en page 123.)
- [Roe 1999] Roe S.M., Prodromou C., O'Brien R., Ladbury J.E., Piper P.W. et Pearl L.H. *Structural Basis for Inhibition of the Hsp90 Molecular Chaperone by the Antitumor Antibiotics Radicicol and Geldanamycin.* J Med Chem, vol. 42, no. 2, 1999. (Cité en page 129.)
- [Roh 2003] Roh M.H. et Margolis B. *Composition and function of PDZ protein complexes during cell polarization.* Am. J. Physiol. Renal Physiol., vol. 285, no. 3, 2003. (Cité en page 124.)
- [Ross 1997] Ross A., Salzmann M. et Senn H. *Fast-HMQC using Ernst angle pulses : An efficient tool for screening of ligand binding to target proteins.* J Bio NMR, vol. 10, 1997. (Cité en page 131.)
- [Ruhl 2011] Ruhl I.D., Salmon E. et Hatcher P.G. *Early diagenesis of Botryococcus braunii race A as determined by high resolution magic angle spinning (HRMAS) NMR.* Org Geochem, vol. 42, no. 1, 2011. (Cité en page 123.)
- [Schanda 2005a] Schanda P. et Brutscher B. *Very Fast Two-Dimensional NMR Spectroscopy for Real-Time Investigation of Dynamic Events in Proteins on the Time Scale of Seconds.* J Am Chem Soc, vol. 127, no. 22, 2005. (Cité en pages 130 et 131.)

- [Schanda 2005b] Schanda P., Kupče Ě. et Brutscher B. *SOFAST-HMQC Experiments for Recording Two-dimensional Deteronuclear Correlation Spectra of Proteins within a Few Seconds*. J Biomol NMR, vol. 33, no. 4, 2005. (Cité en page 131.)
- [Shai 2007] Shai A., Brake T., Somoza C. et Lambert P.F. *The Human Papillomavirus E6 Oncogene Dysregulates the Cell Cycle and Contributes to Cervical Carcinogenesis through Two Independent Activities*. Cancer Res, vol. 67, no. 4, 2007. (Cité en page 124.)
- [Shestakova 2011] Shestakova P., Willem R. et Vassileva E. *Elucidation of the Chemical and Morphological Structure of Double-Network (DN) Hydrogels by High-Resolution Magic Angle Spinning (HRMAS) NMR Spectroscopy*. Chem. Eur. J., vol. 17, no. 52, 2011. (Cité en pages 1 et 123.)
- [Shintu 2004] Shintu L., Ziarelli F. et Caldarelli S. *Is high-resolution magic angle spinning NMR a practical speciation tool for cheese samples ? Parmigiano Reggiano as a case study*. 2004. (Cité en page 123.)
- [Shintu 2005] Shintu L. et Caldarelli S. *High-Resolution MAS NMR and Chemometrics : Characterization of the Ripening of Parmigiano Reggiano Cheese*. J. Agric. Food Chem., vol. 53, no. 10, 2005. (Cité en page 123.)
- [Shintu 2006] Shintu L. et Caldarelli S. *Toward the Determination of the Geographical Origin of Emmental(er) Cheese via High Resolution MAS NMR : A Preliminary Investigation*. J. Agric. Food Chem., vol. 54, no. 12, 2006. (Cité en page 123.)
- [Simpson 2001] Simpson A.J., Kingery W.L., Shaw D.R., Spraul M., Humpfer E. et Dvortsak P. *The application of 1H HR-MAS NMR spectroscopy for the study of structures and associations of organic components at the solid-aqueous interface of a whole soil*. Environ Sci Technol, vol. 35, no. 16, 2001. (Cité en page 123.)
- [Songyang 1997] Songyang Z. *Recognition of Unique Carboxyl-Terminal Motifs by Distinct PDZ Domains*. Science, vol. 275, no. 5296, 1997. (Cité en page 124.)
- [Tessem 2010] Tessem M.B., Seln es K.M., Sjursen W., Tran  G., Giske deg rd G.F., Bathen T.F., Gribbestad I.S. et Hofsl  E. *Discrimination of Patients with Microsatellite Instability Colon Cancer using 1H HR MAS MR Spectroscopy and Chemometric Analysis*. J. Proteome Res., vol. 9, no. 7, 2010. (Cité en page 123.)
- [Trond R vik St rseth 2008] Trond R vik St rseth, Chauton M.S. et Krane J. *HR MAS NMR Spectroscopy of Marine Microalgae, Part 2 : 13C and 13C HR MAS NMR Analysis Used to Study Fatty Acid Composition and Polysaccharide Structure*. Mod Magn Res, vol. 2, 2008. (Cité en page 123.)
- [Valentini 2011] Valentini M., Ritota M., Cafiero C., Cozzolino S., Leita L. et Sequi P. *The HRMAS-NMR tool in foodstuff characterisation*. Magn. Reson. Chem., vol. 49, 2011. (Cité en page 123.)
- [Violette 2008] Violette A., Lancelot N., Poschalko A., Piotto M., Briand J.P., Raya J., Elbayed K., Bianco A. et Guichard G. *Exploring Helical Folding of Oligoureas During Chain Elongation by High-Resolution Magic-Angle-Spinning*

- (*HRMAS*) *NMR Spectroscopy*. Chem. Eur. J., vol. 14, no. 13, 2008. (Cité en page 123.)
- [Wahyudi 2014] Wahyudi H., Wang Y. et McAlpine S.R. *Dimerization of a heat shock protein 90 inhibitor enhances inhibitory activity*. Org. Biomol. Chem., vol. 12, no. 5, 2014. (Cité en page 128.)
- [Whitesell 2005] Whitesell L. et Lindquist S.L. *HSP90 and the chaperoning of cancer*. Nat Rev Cancer, vol. 5, no. 10, 2005. (Cité en page 128.)
- [Wider 2006] Wider G. et Dreier L. *Measuring Protein Concentrations by NMR Spectroscopy*. J Am Chem Soc, vol. 128, no. 8, 2006. (Cité en page 125.)
- [Wiech 1992] Wiech H., Buchner J., Zimmermann R. et Jakob U. *Hsp90 chaperones protein folding in vitro*. Nature, vol. 358, no. 6382, 1992. (Cité en page 128.)
- [Yao 2004] Yao N.H., He W.Y., Lam K.S. et Liu G. *Solid-phase synthesis of O-glycosylated Nalpha-Fmoc amino acids and analysis by high-resolution magic angle spinning NMR*. J Comb Chem, vol. 6, no. 2, pages 214–219, 2004. (Cité en page 122.)
- [Ziarelli 2012] Ziarelli F., Peng L., Zhang C.C. et Viel S. *High resolution magic angle spinning NMR to investigate ligand–receptor binding events for mass-limited samples in liquids*. J Pharm Biomed Anal, vol. 59, 2012. (Cité en page 123.)

Annexes

ANNEXE I

Introduction et principe : PDZ2/6 et
HR-MAS

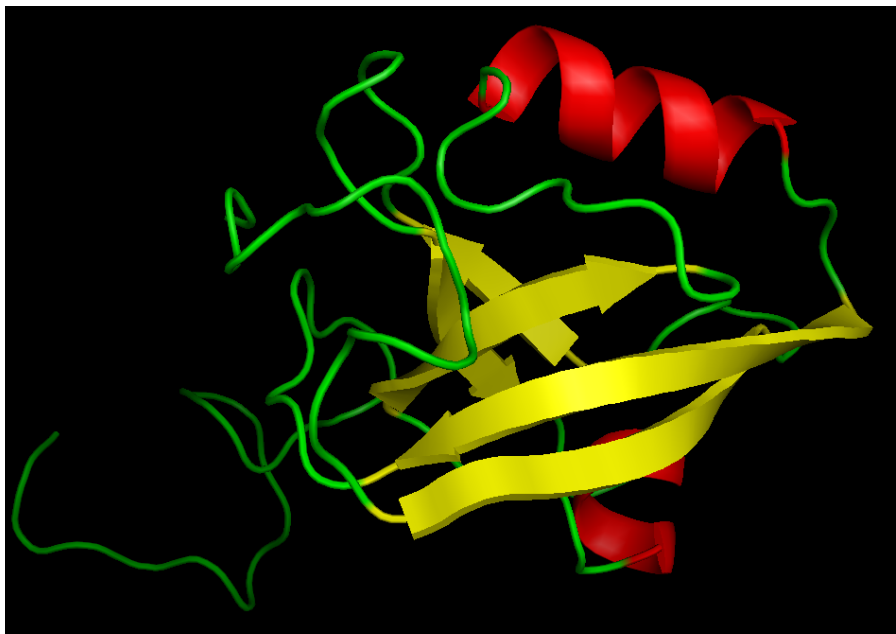


FIGURE I.1 – Structure tridimensionnelle de la protéine PDZ2/6 où sont représentés les hélices α en rouge, feuillets β en jaune et les parties de structure aléatoire en vert. Image réalisée à l'aide du logiciel MacPyMOL.

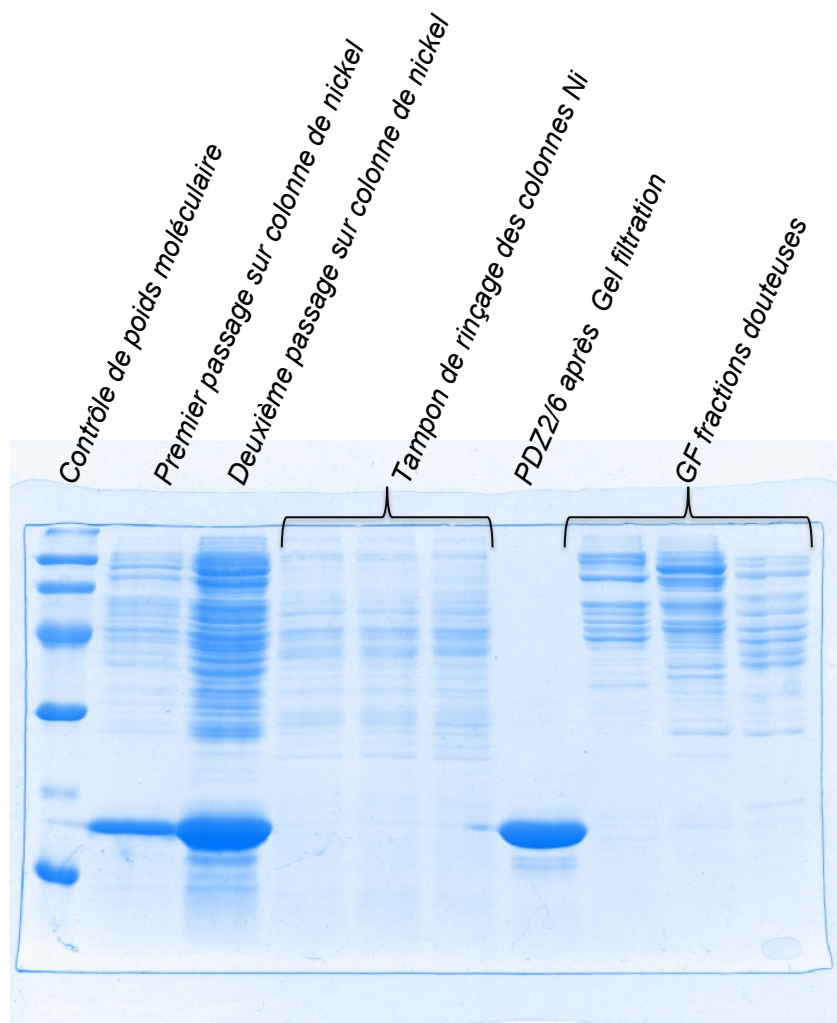


FIGURE I.2 – Gel SDS réalisé après l'étape de purification de PDZ2/6. Le gel montre les diverses étapes de la purification de la protéine.

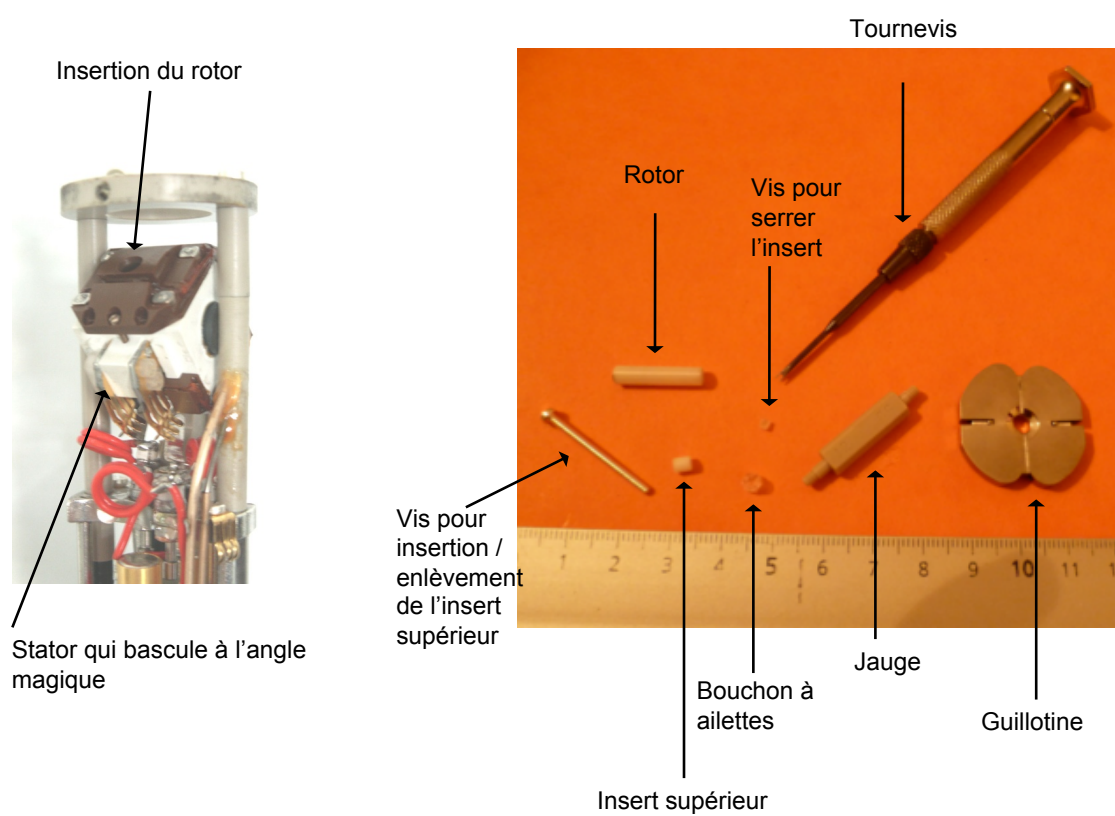


FIGURE I.3 – Matériel HR-MAS. Une photo de la sonde HR-MAS est présentée à gauche. A droite sont présentés les outils, le rotor HR-MAS de $50 \mu\text{L}$ et son insert. Le rotor est en oxyde de zirconium, le bouchon et les inserts sont en Kel-F.

ANNEXE J

Analyse HR-MAS de protéines

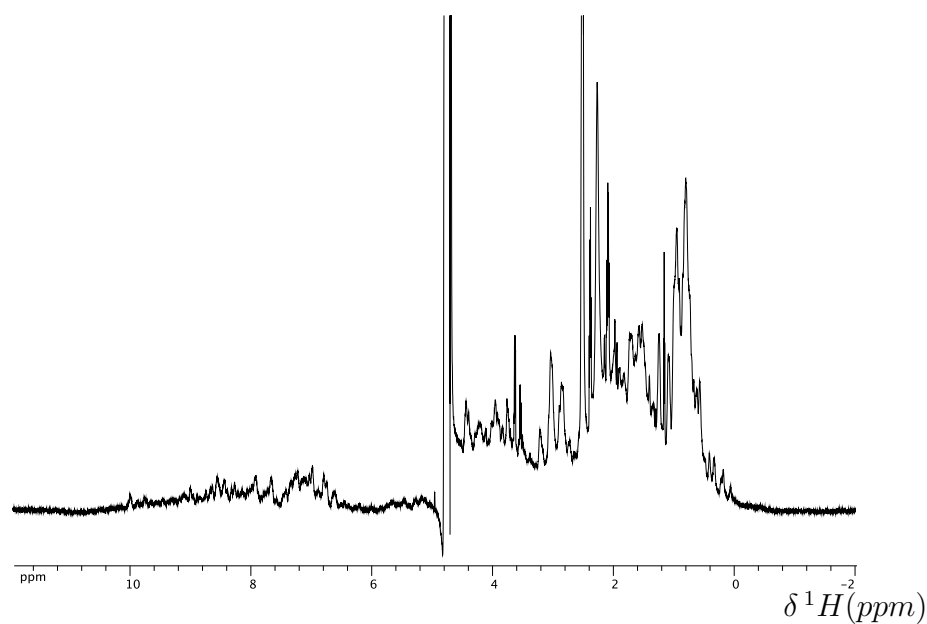


FIGURE J.1 – Spectre 1D ^1H du PDZ2/6 liquide (avant greffage sur phase) réalisé à 800 MHz. PDZ2/6=70 μg , NS=64

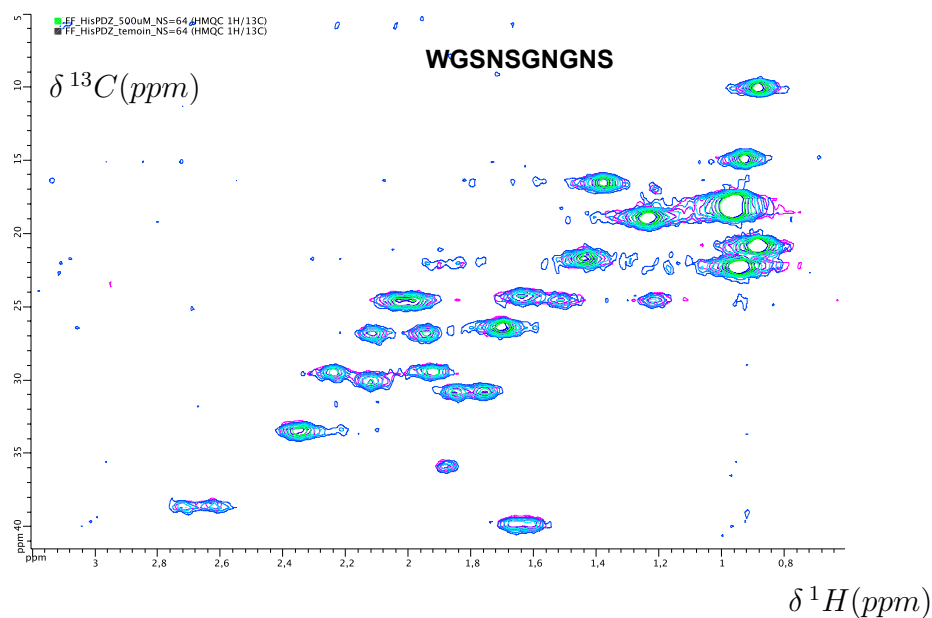


FIGURE J.2 – Spectres 2D ^1H - ^{13}C méthyl-SOFAST-HMQC du PDZ2/6 greffé sur Fast Flow puis en interactions avec le peptide WGSNSGNGNS, réalisé à 800 MHz. Le spectre rose représente la protéine PDZ2/6 seule sur phase, et le spectre bleu celui de la protéine en présence du peptide. $\alpha=120^\circ$, NS=64, $T_{scan}=185$ msec, $[\text{PDZ2/6}]=230$ μM , $[\text{WGSNSGNGNS}]=2$ équivalents. Temps total d'expérience de 27 minutes.

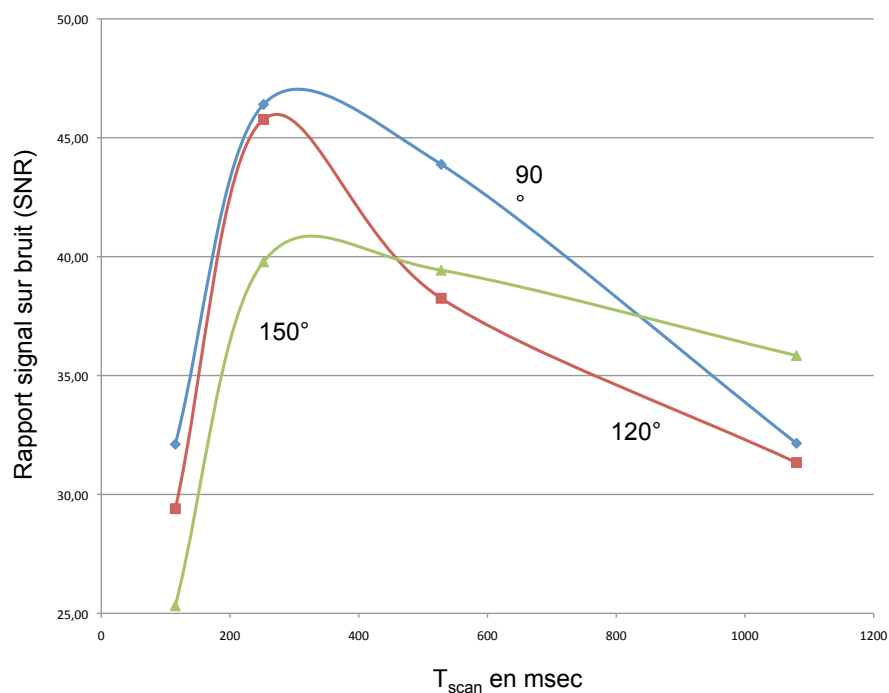


FIGURE J.3 – Courbes du rapport Signal sur Bruit (SNR) en fonction du taux de répétition T_{scan} en millisecondes pour l'optimisation de la séquence méthyl-SOFAST-HMQC sur un échantillon d'HSP90 non marqué fixé sur phase Fast Flow, réalisé à 400 MHz. L'angle α est testé à trois valeurs, 90° pour la courbe bleue, 120° pour la courbe rouge et 150° pour la courbe verte.

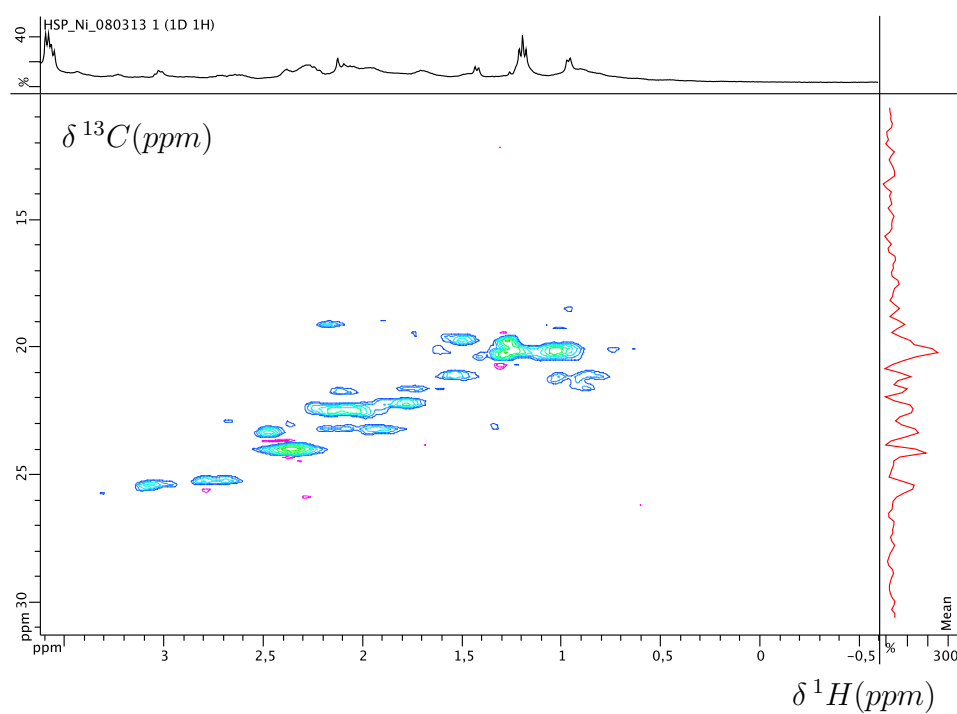


FIGURE J.4 – Spectre ^1H - ^{13}C méthyl-SOFAST-HMQC de HSP90 sur phase NiNTA, réalisé à 400 MHz. $\alpha=90^\circ$, NS=1024, $d1=0,036\text{sec}$, $T_{scan}=0,12\text{sec}$, $[\text{HSP90}]=700\ \mu\text{M}$ pour un temps total d'expérience de 4 heures et 42 minutes.

Justine VIÉVILLE

Etudes d'interactions moléculaires par RMN dans les systèmes complexes

Résumé

La RMN est un outil analytique extrêmement puissant pour l'analyse quantitative et structurale, et est très utilisée en biologie structurale. C'est dans ce contexte que nous avons choisi d'étudier les interactions par RMN.

Le premier système choisi est un système de polymères, les PEO. Ils sont caractérisés par plusieurs grandeurs physiques dont l'indice de polydispersité. Cet indice représente la distribution de taille d'une population de polymères. Nous avons développé une nouvelle méthode de diffusion par RMN, la DOSY afin d'accéder à cet indice : J. Viéville et al. / Journal of Magnetic Resonance 212 (2011) 169–173

Le deuxième système complexe étudié est un type de molécules chimiques mimétiques de l'ADN, les PNA, acides nucléiques peptidiques. Les PNA possèdent des bases nucléiques leur permettant de former des liaisons avec l'ADN ou l'ARN. Nous avons montré par des analyses de RMN que les PNA en solution peuvent former des complexes très stables avec des températures de fusion élevées. Ces analyses RMN sont complétées par des analyses de dichroïsme circulaire.

Afin de compléter notre panel d'études sur les interactions moléculaires par RMN, nous avons étudié les interactions protéine-ligand avec greffage de la protéine sur phase solide : J.M.P. Viéville et al. / Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 89 (2014) 18–23

Mots clés : RMN, systèmes complexes, DOSY, PNA, HR-MAS

Abstract

NMR is a powerful technique we decided to extend to follow interactions in complex mixtures.

First part is about polydispersity index of polymer which is an important physical parameter when working with polymers. We developed here a new method, based on PEO analysis, using diffusion experiments (DOSY) by NMR to assess the polydispersity index: J. Viéville et al. / Journal of Magnetic Resonance 212 (2011) 169–173.

In a second time, we worked on peptidic nucleic acids, PNA. These chemical molecules are designed to bind DNA or RNA for clinical studies. We studied PNA in solution, by NMR to show which kind of interactions they form on themselves. We found very stable complexes with high fusion temperatures. Circular dichroism measurements were helpful for fusion temperature determination and structural studies.

To complete this panel, we were interested in the study of protein-ligand interaction. We developed a new way to follow them, using a grafted protein on a solid phase based on HR-MAS NMR technology: J.M.P. Viéville et al. / Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 89 (2014) 18–23

Keywords : NMR, complex mixtures, DOSY, PNA, HR-MAS

