



# Méthodes d'acquisition rapide de spectres RMN multidimensionnels. Application à l'étude structurale de protéines.

Bernhard Brutscher

► **To cite this version:**

Bernhard Brutscher. Méthodes d'acquisition rapide de spectres RMN multidimensionnels. Application à l'étude structurale de protéines.. Biologie structurale [q-bio.BM]. Université Joseph Fourier, 2005. <tel-01301820>

**HAL Id: tel-01301820**

**<http://hal.univ-grenoble-alpes.fr/tel-01301820>**

Submitted on 13 Apr 2016

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

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

**DIPLOME D'HABILITATION A DIRIGER DES RECHERCHES DE  
L'UNIVERSITE JOSEPH FOURIER DE GRENOBLE**

*Comité d'Habilitation de Physique*

Méthodes d'acquisition rapide  
de spectres RMN multidimensionnels.  
Application à l'étude structurale de protéines.

**Bernhard BRUTSCHER**

DHDR soutenue le 26 janvier 2005  
devant la Commission d'Examen composée de :

Prof. Geoffrey Bodenhausen	Rapporteur
Prof. Eric Guittet	Rapporteur
Prof. Christian Roumestand	Rapporteur
Prof. Claude Berthier	Examineur
Prof. Elie Belorizky	Examineur
Dr. Jean-Pierre Simorre	Examineur

*Institut de Biologie Structurale*

*Jean-Pierre Ebel*

*Laboratoire de Résonance  
Magnétique Nucléaire*



Direction  
des  
Sciences du Vivant



Département de  
Sciences Chimiques

# SOMMAIRE

<b>1</b>	<b><i>Introduction</i></b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b><i>Méthodes d'acquisition rapide de spectres RMN multidimensionnels</i></b>	<b>3</b>
<b>2.1</b>	<b>Méthodes de traitement non-linéaire des données RMN</b>	<b>5</b>
<b>2.2</b>	<b>La RMN multidimensionnelle projetée</b>	<b>6</b>
2.2.1	Acquisition d'une expérience projetée (n,k)-D	7
2.2.2	Transformation des données de projection de l'espace temps à l'espace fréquence	9
2.2.3	Analyse directe des spectres projetés: exploitation des propriétés de symétrie	10
2.2.4	Analyse des spectres projetés par reconstruction du spectre multidimensionnel	12
2.2.5	Comparaison des méthodes d'analyse directe et de reconstruction	14
<b>2.3</b>	<b>La RMN multidimensionnelle filtrée</b>	<b>15</b>
2.3.1	Filtres d'édition spectrale	15
2.3.2	Spectroscopie Hadamard	16
<b>2.4</b>	<b>La RMN multidimensionnelle en une seule acquisition</b>	<b>18</b>
<b>3</b>	<b><i>Expériences pour l'attribution rapide <math>^1\text{H}</math>, <math>^{13}\text{C}</math>, et <math>^{15}\text{N}</math> des protéines</i></b>	<b>20</b>
<b>3.1</b>	<b>Attribution séquentielle de la chaîne principale</b>	<b>20</b>
3.1.1	Stratégie d'attribution d'une protéine enrichie uniformément en $^{13}\text{C}$ et $^{15}\text{N}$	20
3.1.2	Expériences (3,2)-D H-N-X unidirectionnelle pour l'attribution de petites protéines	21
3.1.3	Application aux protéines de plus grande taille: expériences ((3,2)+1)-D H-N-X	24
3.1.4	Attribution séquentielle rapide de protéines deutérées	27
<b>3.2</b>	<b>Attribution <math>^1\text{H}</math> et <math>^{13}\text{C}</math> des chaînes latérales</b>	<b>28</b>
<b>4</b>	<b><i>Détermination rapide du repliement des protéines</i></b>	<b>32</b>
<b>4.1</b>	<b>Contraintes structurales pour la détermination rapide du repliement global</b>	<b>32</b>
<b>4.2</b>	<b>Expérience pour la mesure rapide de distances entre méthyles</b>	<b>33</b>
4.2.1	Filtre d'édition spectrale par type d'acide aminé	35
4.2.2	Application aux protéines de petite taille	37
<b>4.3</b>	<b>Expérience pour la mesure rapide de couplages dipolaires résiduels</b>	<b>39</b>
4.3.1	Les couplages dipolaires résiduels	39
4.3.2	L'expérience ((3,2)+1)-D J-HNCO(H)	39

<b>5</b>	<b><i>Application à l'étude structurale du domaine N-terminal de la réductase mercurique de Ralstonia metallidurans</i></b>	<b>42</b>
5.1	Contexte biologique de la réductase mercurique	42
5.2	Attribution et structure secondaire de MerAa	43
5.3	Détermination du repliement global de MerAa	44
5.4	Site de fixation du mercure	45
<b>6</b>	<b><i>Perspectives (projets de recherche)</i></b>	<b>47</b>
6.1	Méthodes rapides pour le raffinement structural de protéines	47
6.2	Application des techniques de RMN projetée ou filtrée à l'étude structurale d'acides nucléiques	48
6.3	L'étude structurale par RMN de protéines de plus grande taille	48
6.4	Contraintes structurales à très longue portée pour l'étude structurale de complexes moléculaires	50
6.5	Utilisation de la RMN solide pour l'étude de systèmes moléculaires insolubles	52
	<b><i>Annexe: les matrices G et les matrices Hadamard</i></b>	<b>54</b>
<b>7</b>	<b><i>Références</i></b>	<b>55</b>

## Liste des abréviations utilisées

ADN	Acide désoxyribonucléique
ARN	Acide ribonucléique
BRP	<i>Bleomycine resistance protein</i>
COSY	<i>Correlation spectroscopy</i> – Expérience RMN permettant de corrélérer deux spins couplés (par couplage $J$ )
CT	<i>constant time frequency labeling</i> – technique d'édition de fréquence dans une dimension indirecte du spectre multidimensionnel
DEPT	<i>Distortionless enhancement by polarization transfer</i> – technique de filtrage pour séparer les signaux RMN provenant de différents groupements $SI_n$
DFT	<i>Discrete Fourier transform</i> - transformation de Fourier discrète
DIPSAP	<i>double-inphase-single-antiphase filter</i> – technique de séparation spectral des différentes lignes d'un multiplet
DNP	<i>Dynamic nuclear polarisation</i> - technique de transfert de polarisation d'un spin électronique aux spins nucléaires
EPI	<i>Echo planar imaging</i> – technique d'imagerie par résonance magnétique rapide
FDM	<i>Filter diagonalisation method</i> - technique de traitement des données RMN
FFT	<i>Fast Fourier transform</i> - transformation de Fourier rapide
FID	<i>Free induction decay</i> – signal RMN de précession libre détecté dans une bobine
FMN	Flavine mononucléotide
FT	<i>Fourier transform</i> - transformation de Fourier
GFT	<i>G-matrix-Fourier transformation</i> – multiplication par une matrice $G$ suivie par une transformation de Fourier
HSQC	<i>Heteronuclear single-quantum coherence spectroscopy</i> – expérience RMN basée sur des transferts INEPT corrélant deux spins hétéronucléaires
IBS	Institut de biologie structurale
INEPT	<i>Insensitive nuclei enhancement by polarisation transfer</i> - technique de transfert de polarisation entre deux spins hétéronucléaires
IRM	Imagerie par résonance magnétique
J	Couplage scalaire entre deux spins
LP	<i>Linear prediction</i> – technique de traitement des données RMN
MaxEnt	<i>Maximum entropy</i> - technique de traitement des données RMN
MBP	<i>Maltose binding protein</i>

MerA, (T, P)	Protéines de l'opéron mer impliquées dans la résistance bactérienne au mercure.
MerAa	Fragment N-terminal de la réductase mercurique (MerA)
nD	Dimensionnalité d'une expérience RMN
NOE	<i>Nuclear Overhauser enhancement</i> – transfert de polarisation entre deux spins nucléaire en interaction dipolaire, effet proportionnel à $R^{-6}$ avec R la distance séparant les deux noyaux
NOESY	<i>Nuclear Overhauser enhancement</i> spectroscopy – expérience RMN particulièrement importante pour l'étude de structure moléculaire en solution
Omp	<i>Outer membrane protein</i>
PDB	<i>Protein data bank</i> – base de données de coordonnées des structures de biomolécules
ppm	Unité: partie par million ( $10^{-6}$ )
rf	radiofréquence
RDC	<i>Residual dipolar coupling</i> – couplage dipolaire résiduel induit par un alignement partiel de la molécule en solution
RMN	Résonance magnétique nucléaire
SiR	Sulfite réductase
SiR-FP18	Domaine flavodoxine monomérique de SiR (poid moléculaire de 18kD)
S/N	<i>Signal to noise ratio</i> – rapport signal sur bruit
SW	<i>Spectral width</i> – largeur spectrale
TOCSY	<i>Total correlation spectroscopy</i> – Expérience RMN permettant de corrélérer tous les spins formant un réseau de spins couplés (par couplage J)
TROSY	<i>Transverse relaxation-optimised spectroscopy</i> – technique RMN exploitant un effet de corrélation entre deux mécanismes de relaxation pour augmenter la résolution et/ou la sensibilité d'une expérience RMN

## 1 Introduction

Depuis sa première observation en 1944 par Felix Bloch et Edward Purcell <sup>[1]</sup>, la Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) a toujours fasciné un grand nombre de scientifiques. La beauté de cette technique réside dans le fait qu'elle permet de manipuler facilement et d'une manière contrôlée un système de spins, dont les propriétés sont décrites par la mécanique quantique et statistique, afin d'obtenir des informations précieuses sur la structure et la dynamique de la matière. Grâce au développement d'un très grand nombre d'outils RMN (séquences d'impulsions), la RMN a trouvé de nombreuses applications dans des domaines de recherche aussi divers que la physique, les sciences des matériaux, la chimie, la biologie et la médecine.

Un pas crucial dans le développement de la RMN a été l'introduction en 1966 par Weston Anderson et Richard Ernst <sup>[2]</sup> du concept de l'acquisition d'un signal RMN évoluant dans le temps (FID) après une excitation polychromatique du système de spins, et sa conversion en spectre RMN par transformation de Fourier (FT). La FT-RMN a permis d'augmenter considérablement la sensibilité de la technique. Une deuxième innovation majeure a été la RMN multidimensionnelle (RMN-*n*D) introduite par Jean Jeener et Richard Ernst au début des années 70 <sup>[3]</sup>. La RMN-*n*D a notamment permis d'augmenter la résolution des spectres RMN en étalant les signaux RMN le long de plusieurs dimensions par les différentes fréquences de noyaux formant un réseau de spins couplés. L'introduction de la FT-RMN-*n*D a aussi ouvert la porte à la conception d'innombrables séquences d'impulsions permettant de manipuler les spins nucléaires afin de les corrélérer entre eux et d'éditer leurs propriétés spectroscopiques (fréquences, couplages, vitesses de relaxation, ...) dans les différentes dimensions du spectre. Ces deux développements, qui ont été récompensés par le prix Nobel de chimie attribué à Richard Ernst en 1991, sont à la base de la grande majorité des applications RMN, notamment dans le domaine de la biologie structurale qui nous intéresse plus particulièrement ici.

Au cours des 20 dernières années, la RMN s'est établie comme la principale technique pour l'étude structurale et dynamique en solution des macromolécules biologiques. Aujourd'hui, environ 20% des structures déposées dans la *Protein data bank (PDB)* (<http://www.rcsb.org/pdb>) ont été résolues par RMN. La majorité des coordonnées déposées concernent des protéines en forme cristalline dont les structures ont été déterminées par diffraction des rayons X. Les progrès faits sur le plan de l'instrumentation RMN, de la préparation des échantillons biomoléculaires, et des développements spectroscopiques ont permis de repousser les limites de la RMN biomoléculaire. Depuis la première structure résolue par RMN en 1985 d'une petite protéine de 57 résidus, 6kDa (BUSI-IIa)<sup>[4]</sup>, le champ magnétique des spectromètres RMN commerciaux a augmenté d'environ 10 à 21T, et les composants électroniques sont devenus plus performants et plus fiables. Le développement de techniques de surexpression des protéines, notamment dans les cellules bactériennes, et de purification ont permis d'obtenir des échantillons purs et concentrés. L'enrichissement des échantillons en isotopes stables à spin  $S=1/2$  (<sup>13</sup>C, <sup>15</sup>N) a permis de disposer

davantage de sondes RMN au sein de la molécule, et la deutération partielle ou complète de la molécule supprime certaines sources de relaxation des spins permettant ainsi d'augmenter la sensibilité et la résolution des expériences RMN. Enfin, ces progrès techniques ont toujours été accompagnés par le développement de nouvelles expériences RMN exploitant des effets jusqu'alors difficilement accessibles ou mal connus. Des exemples récents sont les effets induits par l'alignement spontané ou induit (par un milieu orientant) des molécules dans le champ magnétique <sup>[5]</sup>, l'exploitation des effets de relaxation par corrélation croisée <sup>[6]</sup>, ou encore le transfert de cohérence à travers une liaison hydrogène <sup>[7]</sup>. Ainsi la RMN permet aujourd'hui d'étudier la structure et la dynamique de protéines isolées ou en complexe d'un poids moléculaire allant jusqu'à 40 à 60kDa (Figure 1).

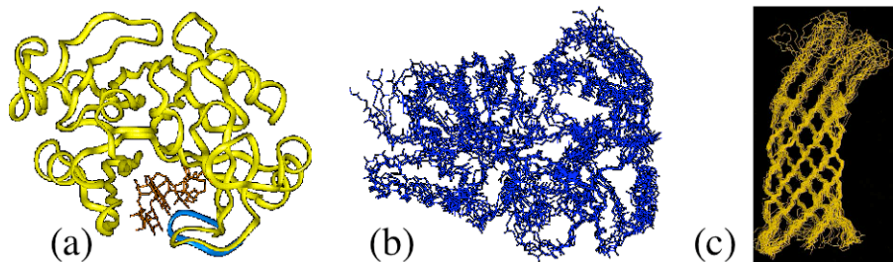


FIGURE 1. Exemples de protéines récemment étudiées par RMN: (a) protéine de résistance à la bléomycine (BRP, 30kDa) avec son ligand [8], (b) protéine de liaison à la maltodextrine (MBP, 42kDa)[9], (c) protéine de la membrane extérieure reconstituée dans des micelles (Omp-X,  $\approx 60kDa$ )[10,11].

Avec le séquençage du génome de différents organismes, la RMN est amenée à jouer un rôle important dans le contexte de la génomique structurale, notamment pour la détermination rapide du repliement de protéines de taille modérée. C'est pourquoi il est important de développer de nouvelles méthodes permettant d'accélérer les différentes étapes nécessaires à la caractérisation structurale et dynamique d'une protéine par RMN. Le travail présenté ici s'inscrit dans ce contexte. Différentes techniques ont été mises au point pour réduire le temps d'acquisition d'un jeu complet de spectres RMN permettant l'attribution des fréquences de résonance et la détermination du repliement de la protéine. Les concepts des principales méthodes d'acquisition rapide de données RMN sont résumés au chapitre 2. La stratégie mise au point pour l'étude RMN de protéines de taille modérée est ensuite exposée aux chapitres 3 et 4. Cette stratégie, basée sur une suite de nouvelles expériences, exploite les avantages de différentes techniques d'acquisition rapide. Au chapitre 5, une application de cette nouvelle méthodologie à la détermination du repliement d'un fragment protéique de 67 résidus (MerAa), est présentée. Pour conclure, de futurs projets de développement de nouvelles méthodes en RMN biomoléculaire sont brièvement introduits au chapitre 6.



## 2 Méthodes d'acquisition rapide de spectres RMN multidimensionnels

Dans une expérience de corrélation des spins I et S à 2 dimensions, les fréquences de résonance des spins S sont échantillonnées de manière indirecte par une modulation du signal détecté. En pratique, une cohérence du spin S est créée par une suite d'impulsions radiofréquence (rf) et de délais, suivie par une période d'évolution libre du système de spin pendant un délai  $t_1$ . Ensuite une deuxième séquence d'impulsions rf permet de transférer l'aimantation des spins S aux spins I dont l'évolution temporelle ( $t_{acq}$ ) est détectée directement. Typiquement, l'expérience est répétée  $N_1$  fois en incrémentant le délai d'évolution libre ( $t_1$ ) entre chaque répétition (FID) de  $\Delta t_1$ . Le spectre RMN 2D  $S(\omega_1, \omega_{acq}) = S(\omega_s, \omega_i)$  est ensuite obtenu par transformation de Fourier successive le long des deux dimensions  $t_1$  et  $t_{acq}$ . Ce concept peut être généralisé aux expériences à  $n$  dimensions en rajoutant d'autres délais incrémentés et transferts entre spins.

Pour des raisons de sensibilité les spins  $^1\text{H}$  sont généralement excités au début et détectés à la fin d'une expérience de corrélation hétéronucléaire ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ ). Le schéma typique d'une expérience de corrélation 3D H-X-Y est illustré dans la figure 2.

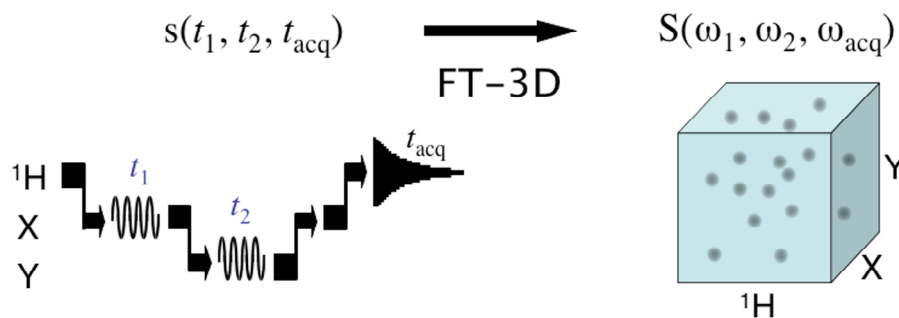


FIGURE 2. Schéma d'une expérience de corrélation 3D H-X-Y. Les deux variables de temps  $t_1$  et  $t_2$  sont incrémentées indépendamment. Le spectre  $S(\omega_1, \omega_2, \omega_{acq}) = S(\omega_X, \omega_Y, \omega_H)$  est ensuite obtenu par transformation de Fourier (FT) successives le long des 3 axes  $t_1$ ,  $t_2$  et  $t_{acq}$ .

La résolution spectrale dans une dimension indirecte  $\omega_1$  est inversement proportionnelle au nombre d'incrément  $N_1$  et à l'incrément de temps  $\Delta t_1$  donné par le théorème de Nyquist qui impose l'échantillonnage du signal à une fréquence  $\nu = 1/\Delta t_1 \geq SW_1$  où  $SW_1$  est la largeur spectrale. Pour accéder au signe des fréquences, deux expériences sont enregistrées pour chaque point  $t_1$  (détection en quadrature) correspondant à la partie réelle et imaginaire du signal temporel. Le temps expérimental  $T_{nD}$  est alors déterminé par le nombre d'incrément  $N_i$  dans les différentes dimensions indirectes, le nombre de répétitions  $N_s$  choisi pour moyennner le signal dans la dimension de détection, et le délai de répétition  $\tau_{rep}$  entre deux acquisitions permettant le retour à l'équilibre thermodynamique du système de spins qui, pour les protéines, est typiquement de l'ordre de la seconde.

$$T_{nD} = 2^{n-1} \tau_{rep} N_s \prod_{i=1}^{n-1} N_i \quad [1]$$

En conséquence, le temps minimal requis pour l'enregistrement d'un spectre  $nD$  dépend fortement de la résolution spectrale souhaitée dans les différentes dimensions indirectes, et augmente en général d'environ deux ordres de grandeur par dimension ajoutée (Figure 3).

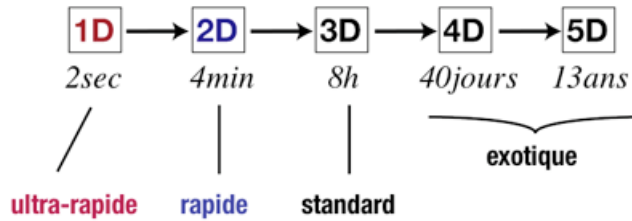


FIGURE 3. Temps minimal requis pour une expérience  $nD$  avec  $\tau_{rep} = 1s$ ,  $N_s = 2$  et  $N_i = 60$  pour chaque dimension indirecte

Avec 60 incréments de temps, la résolution digitale est en générale très inférieure à la résolution spectrale maximale donnée par la largeur de raie des résonances. Ceci implique que les expériences 4D ou 5D ne sont réalisables qu'en compromettant très fortement la résolution dans les différentes dimensions indirectes.

Un deuxième critère déterminant la durée d'une expérience  $nD$  est sa *sensibilité*, c'est-à-dire la nécessité d'obtenir un rapport signal sur bruit (S/N) suffisant pour distinguer un pic de corrélation du bruit. A part la sensibilité intrinsèque de chaque séquence d'impulsions RMN due à l'efficacité des transferts et les propriétés de relaxation des spins impliqués, le rapport S/N dépend du nombre de répétitions (scans)  $N_s$ , de la dimensionalité  $n$  et du nombre d'incrément dans chaque dimension indirecte  $N_i$ . En l'absence de décroissance du signal pendant les périodes d'évolution libre  $t_1, t_2, \dots$  (situation retrouvée pour une édition de fréquence à temps constant), le rapport S/N d'une expérience  $nD$  est donné par :

$$\frac{S}{N} \propto \sqrt{N_s \prod_{i=1}^{n-1} N_i} \left( \frac{1}{\sqrt{2}} \right)^{n-1} \propto \sqrt{T_{nD}} \frac{1}{\sqrt{2}^{n-1}} \quad [2]$$

Le rapport S/N augmente donc linéairement avec la racine du temps expérimental  $T_{nD}$ . Dans le passé, le temps expérimental était souvent déterminé par une faible sensibilité des expériences nécessitant l'accumulation du signal pendant typiquement 2 à 3 jours, ce qui a fait de la RMN 3D la technique de choix pour l'étude d'échantillons biomoléculaires.



FIGURE 4: Quelques exemples d'amélioration technique ou spectroscopique des expériences RMN permettant un gain important en sensibilité.

Avec les progrès récents réalisés au niveau des champs magnétiques, des spectromètres RMN, et des techniques spectroscopiques, la sensibilité d'un grand nombre d'expériences a

augmenté d'un facteur 3 à 10 (Figure 4), ce qui équivaut une réduction du temps expérimental d'un facteur 10 à 100 afin d'obtenir le même rapport S/N qu'auparavant (Eq. [2]). En conséquence, pour beaucoup d'expériences RMN multidimensionnelles le temps expérimental n'est aujourd'hui plus déterminé par des considérations de sensibilité. Un temps d'acquisition de quelques minutes à quelques heures est souvent suffisant pour obtenir un rapport S/N correct, mais des temps beaucoup plus longs sont nécessaires pour échantillonner suffisamment de points dans les dimensions indirectes d'une expérience 3D (ou 4D, 5D, ...) afin d'atteindre une résolution spectrale convenable. C'est pourquoi, des stratégies alternatives à la FT-RMN- $nD$  classique, permettant d'échantillonner l'espace  $n$ -dimensionnel dans un temps réduit, ont été développées et sont exposées dans la suite de ce chapitre.

Le principe général des différentes méthodes d'acquisition rapide est un *échantillonnage non-uniforme* dans l'espace temps. Le nombre de répétitions d'expériences 1D est réduit en limitant le nombre de points échantillonnés dans les dimensions indirectes de l'expérience  $nD$ . Pour ne pas diminuer la résolution spectrale, les points sont en général distribués d'une manière non-uniforme sur la grille de points espacés de  $\Delta t_i$  ( $i=1, 2, \dots$ ) dans les différentes dimensions. Un exemple d'un tel échantillonnage non-uniforme est donné dans la Figure 5b.

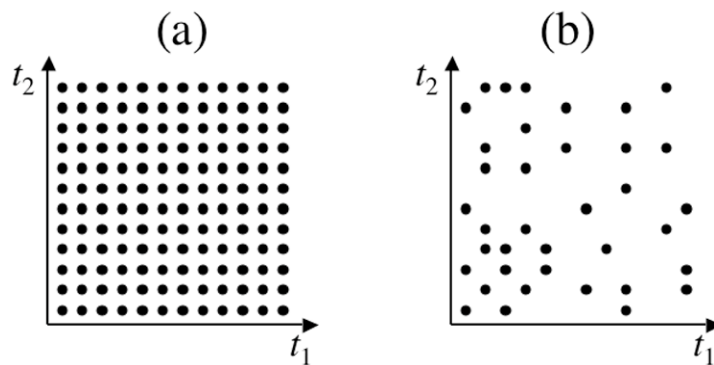


FIGURE 5. Échantillonnage uniforme (a) et non uniforme (b) des deux dimensions indirectes d'un spectre RMN 3D. Chaque point correspond à l'acquisition d'un FID.

## 2.1 Méthodes de traitement non-linéaire des données RMN

Un échantillonnage non uniforme, comme montré dans la figure 5b, nécessite d'autres méthodes qu'une transformation de Fourier rapide (FFT) pour la reconstruction du spectre  $nD$ . Bien que, en théorie, il soit toujours possible d'appliquer une transformation de Fourier discrète (DFT) bidimensionnelle aux données échantillonnées de cette manière, cette méthode n'est (à ma connaissance) pas utilisée en pratique, probablement à cause des temps excessifs de calcul et des artefacts créés dans le spectre par un tel traitement. A la place, d'autres méthodes de reconstruction non linéaires ont été proposées et appliquées par le passé pour traiter des données RMN échantillonnées de manière non uniforme : par exemple la prédiction linéaire (LP) <sup>[12]</sup>, la méthode d'entropie maximale (MaxEnt) <sup>[13]</sup>, ou la méthode de filtre de diagonalisation (FDM) <sup>[14]</sup>. Ces techniques sont basées sur une optimisation itérative de reconstruction d'un spectre le

plus en accord avec les données expérimentales. Elles permettent de réduire le nombre de points échantillonnés d'un facteur 4 à 6 environ en gardant une bonne qualité du spectre avec la même résolution dans les dimensions indirectes qu'un spectre enregistré d'une manière conventionnelle en 4 à 6 fois plus de temps. Cependant, toutes ces méthodes de traitement non linéaire nécessitent l'ajustement d'un certain nombre de paramètres. Un jeu de paramètres mal optimisé a comme conséquence l'apparition de faux pics ou encore la disparition de pics de faible intensité pour ne citer que les problèmes les plus fréquents. En pratique, le traitement est répété plusieurs fois en faisant varier les paramètres d'optimisation. Pour ces raisons et à cause d'un temps de calcul considérablement plus long que pour une FFT, ces méthodes n'ont pas (encore) suscité beaucoup d'enthousiasme dans la communauté RMN biomoléculaire. Cependant, avec les progrès réalisés ces dernières années au niveau de la sensibilité des expériences RMN, et avec la disponibilité de calculateurs de plus en plus performants, on peut s'attendre à un regain d'intérêt pour ces techniques de reconstruction non-linéaires.

Deux autres méthodes de traitement ont été proposées récemment permettant de gérer des données incomplètes ou échantillonnées d'une manière non-uniforme sans avoir recours à des procédures d'optimisation itérative. (i) Une première approche consiste à convertir le FID échantillonné d'une manière non-uniforme en FID régulier par une interpolation de Lagrange. Il a été montré <sup>[15]</sup> que l'algorithme, développé par Dutt et Rokhlin <sup>[16]</sup> basé sur des multiplications matricielles, permet d'effectuer cette opération de linéarisation des données RMN. Le spectre est ensuite obtenu par une FFT du FID ainsi reconstitué. L'avantage principal de cette technique est qu'elle est simple à implémenter et que l'algorithme ne nécessite aucun ajustement de paramètres. (ii) Une deuxième méthode développée par Brüschweiler et collaborateurs <sup>[17]</sup>, est basée sur une analyse statistique des données RMN pour identifier des spins (fréquences de résonance) corrélés entre eux. Des matrices de covariance  $C$  et de corrélation croisée  $R$  sont calculées à partir de spectres 1D enregistrés à différents temps  $t_1$  après transformation de Fourier (FFT) le long de la dimension directe. La matrice  $R$  est l'équivalent du spectre RMN 2D et peut être visualisée et analysée de la même manière. De nouveau, cette méthode n'impose aucune restriction en termes d'espacement des points  $t_1$  échantillonnés. En plus, elle permet l'application de nombreux concepts d'analyse statistique comme la méthode d'analyse de composantes principales pour extraire l'information recherchée du spectre sur les réseaux de spins couplés <sup>[18]</sup>. Cependant, l'application de cette méthode de covariance est limitée aux expériences *homonucléaires*, c'est-à-dire les expériences où les mêmes spins sont édités en fréquence dans les deux dimensions directes et indirectes du spectre.

## 2.2 La RMN multidimensionnelle projetée

Inspirée par la spectroscopie "accordéon", introduite dans les années 80 par Bodenhausen et Ernst <sup>[19]</sup> pour mesurer plusieurs paramètres spectroscopiques le long de la même dimension indirecte d'un spectre multidimensionnel, la *RMN projetée* permet de mesurer les fréquences de résonance de  $n$  spins ( $n \geq 2$ ) dans une série de spectres à  $k$  ( $k \leq n - 1$ ) dimensions. Nous allons

utiliser dans ce manuscrit la notation  $(n,k)$ -D pour une expérience à  $n$  dimensions projetée sur une série de spectres à  $k$  dimensions. Cette technique, dont les bases ont été développées entre 1993 et 1996<sup>[20]</sup>, est aussi appelée *RMN à dimensionalité réduite*<sup>[20b]</sup> ou *GFT-RMN*<sup>[21]</sup>.

### 2.2.1 Acquisition d'une expérience projetée $(n,k)$ -D

La RMN projetée est basée sur un schéma particulier d'échantillonnage non uniforme de l'espace temporel formé par les différentes dimensions indirectes. L'exemple d'une expérience de corrélation H-X-Y projetée  $(3,2)$ -D est illustré dans la figure 6.

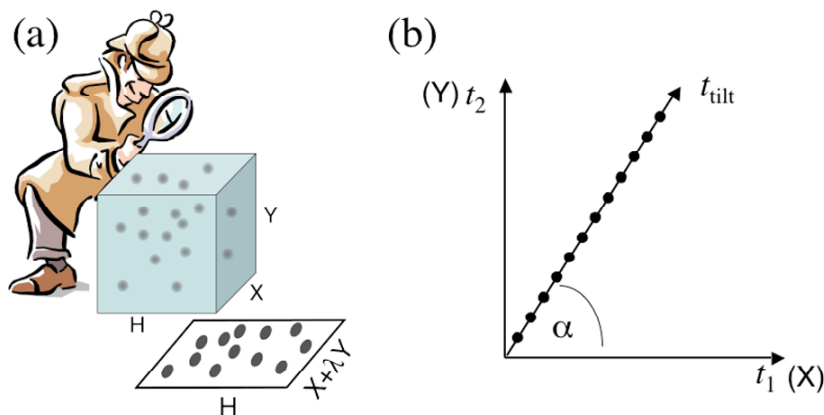


FIGURE 6. (a) projection d'un spectre 3D sur des plans 2D ( $\lambda = \tan \alpha$ ), (b) échantillonnage temporel le long d'un axe incliné  $t_{\text{tilt}}$  permettant de reconstruire le spectre de projection 2D.

Les deux dimensions indirectes  $t_1$  (évolution des spins X) et  $t_2$  (évolution des spins Y) sont échantillonnées le long d'un axe  $t_{\text{tilt}}$  formant un angle  $\alpha_1 = \alpha$  avec  $t_1$  et  $\alpha_2 = (90^\circ - \alpha)$  avec  $t_2$ . L'espacement des points échantillonnés simultanément le long de cet axe incliné est constant, ce qui permet l'utilisation d'une transformation de Fourier rapide (FFT) pour passer de l'espace temps ( $t_{\text{tilt}}$ ) en espace fréquence ( $\omega_{\text{tilt}}$ ). Le spectre ainsi obtenu correspond à la projection du spectre 2D X-Y sur l'axe formant un angle  $\alpha_1$  avec X et  $\alpha_2$  avec Y. Expérimentalement un tel échantillonnage est réalisé en utilisant la même variable de temps  $t_1$  pour échantillonner l'évolution des spins X et Y, avec un incrément de temps de  $\Delta t_1$  pour l'un et  $\lambda \Delta t_1$  pour l'autre (figure 7).

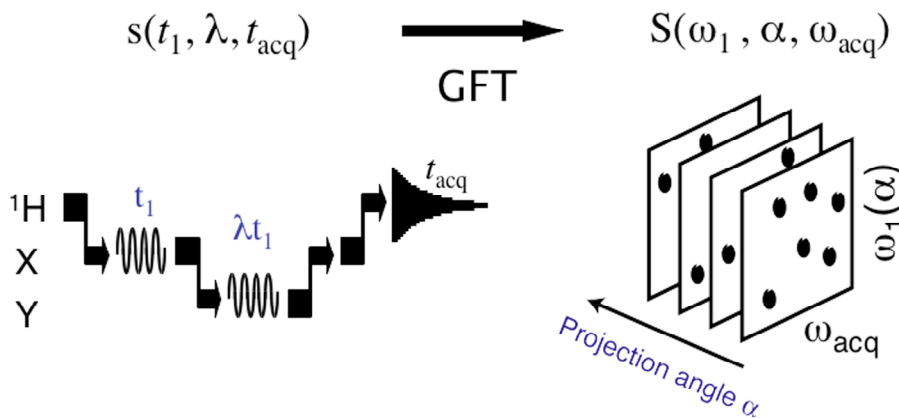


FIGURE 7. Schéma d'une expérience de corrélation  $(3,2)$ -D H-X-Y. Pour chaque  $\lambda$ , 2 spectres de projection  $S_{\pm\alpha}(\omega_1, \pm\alpha, \omega_{\text{acq}}) = S_{\pm\alpha}(\omega_x \pm \omega_y \tan \alpha, \pm\alpha, \omega_H)$  sont obtenus par GFT.

La largeur spectrale  $SW_{\text{tilt}}$  nécessaire pour couvrir toute la gamme spectrale des spins X et Y projetés sur un axe incliné est donnée par

$$SW_{\text{tilt}} = SW_X \cos \alpha + SW_Y \sin \alpha \quad [3]$$

L'incrément de temps  $\Delta t_1$  et le facteur d'échelle  $\lambda$  sont liés à l'angle de projection  $\alpha$  par les relations suivantes :

$$\Delta t_1 = \cos \alpha / SW_{\text{tilt}} \quad [4]$$

$$\lambda = \tan \alpha \quad [5]$$

Pour la *détection en quadrature*, l'expérience est répétée 4 fois par incrément  $t_1$  en faisant varier la phase des séquences d'excitation des spins X et Y de la même manière que dans une expérience 3D standard [20g,21,22]. On détecte alors 4 signaux avec chacun une modulation différente en  $t_1$ . Avec  $\vec{s}(t_1, \lambda, t_{\text{acq}}) = \vec{s}(t_1, \lambda) \exp(i\omega_H t_{\text{acq}})$ , les 4 composantes du vecteur  $\vec{s}(t_1, \lambda)$  sont données par :

$$\vec{s}(t_1, \lambda) = \begin{pmatrix} \cos(\omega_X t_1) \cos(\omega_Y \lambda t_1) \\ \cos(\omega_X t_1) \sin(\omega_Y \lambda t_1) \\ \sin(\omega_X t_1) \cos(\omega_Y \lambda t_1) \\ \sin(\omega_X t_1) \sin(\omega_Y \lambda t_1) \end{pmatrix} \quad [6]$$

Pour le cas général  $(n-k) \geq 1$ , la projection dans l'espace temps le long d'un axe incliné  $t_{\text{tilt}}$  formant des angles  $\alpha_1 = \alpha$  avec  $t_1$ ,  $\alpha_2$  avec  $t_2$ ,  $\alpha_3$  avec  $t_3$ , ... est obtenu en remplaçant  $t_1$  par  $\lambda_1 t_1$ ,  $t_2$  par  $\lambda_2 t_1$ ,  $t_3$  par  $\lambda_3 t_1$ , et ainsi de suite. Les incréments de temps pour les  $K$  ( $K = n - k + 1$ ) dimensions projetées sur l'axe  $t_{\text{tilt}}$  sont donnés par les équations suivantes

$$\Delta t_1 = \cos \alpha / SW_{\text{tilt}} \quad [7]$$

$$\lambda_i = \cos \alpha_i / \cos \alpha, \quad 1 \leq i \leq K \quad [8]$$

$$SW_{\text{tilt}} = \sum_{i=1}^K SW_i \cos \alpha_i \quad [9]$$

Cette fois-ci l'expérience est répétée  $2^K$  fois pour chaque incrément  $t_1$ , résultant en  $2^{K-1}$  spectres de projection avec des pics de corrélation détectés aux fréquences

$$\omega_1 = \omega_X \pm \lambda_Y \omega_Y \pm \lambda_Z \omega_Z \pm \dots \quad [10]$$

Alors que dans une expérience  $nD$  un seul pic de corrélation est détecté par système de spins couplés, dans un spectre  $(n,k)$ -D le signal est distribué sur les  $2^{n-k}$  spectres de projection. Ceci se traduit par un rapport S/N d'un spectre de projection  $P_\alpha$  relatif au spectre  $nD$  donné par :

$$S/N(P_\alpha) = \frac{1}{\sqrt{2^{n-k}}} S/N(nD) \quad [11]$$

En conséquence, dans le même temps expérimental, chacun des  $2^{n-k}$  spectres a un rapport S/N réduit d'un facteur  $1/\sqrt{2^{n-k}}$  par rapport au spectre  $nD$  correspondant. Cette perte de sensibilité est partiellement compensée par l'analyse conjointe des différents spectres de projection en exploitant les propriétés de symétrie <sup>[20f]</sup> comme décrit au sous-chapitre 2.2.3. Néanmoins il est important pour une analyse directe d'un spectre  $(n,k)$ -D que tous les pics de corrélation dans les spectres de projection aient au moins une intensité égale au double de la valeur moyenne du bruit.

Une possibilité d'optimisation de la sensibilité et de la résolution spectrale d'une expérience  $(n,k)$ -D réside dans le choix des angles de projections  $\alpha_i$ . En prenant en compte certaines propriétés du système de spins, comme les vitesses de relaxation des spins édités le long de la dimension de projection, le choix des angles  $\alpha_i$ , et en conséquence des facteurs d'échelle  $\lambda_i$ , permet d'ajuster individuellement les temps d'évolution maximale pour chacun des spins, augmentant ainsi la résolution ou le rapport S/N dans le spectre.

### 2.2.2 Transformation des données de projection de l'espace temps à l'espace fréquence

Prenons d'abord l'exemple d'une expérience  $(3,2)$ -D, les 4 composantes de l'équation [6] permettent la reconstruction de deux spectres de projection  $P_{+\alpha}$  et  $P_{-\alpha}$  <sup>[20g]</sup>. Le signal temporel de ces deux projections est obtenu par multiplication du vecteur  $\vec{s}(t_1, \lambda)$  avec une matrice  $G_4$  (voir Annexe).

$$\begin{pmatrix} s_{+\alpha}(\text{Re}) \\ s_{+\alpha}(\text{Im}) \\ s_{-\alpha}(\text{Re}) \\ s_{-\alpha}(\text{Im}) \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} \cos((\omega_X + \lambda\omega_Y)t_1) \\ \sin((\omega_X + \lambda\omega_Y)t_1) \\ \cos((\omega_X - \lambda\omega_Y)t_1) \\ \sin((\omega_X - \lambda\omega_Y)t_1) \end{pmatrix} = G_4 \vec{s}(t_1, \lambda) \quad [12]$$

Les données ainsi transformées peuvent ensuite être traitées par transformation de Fourier rapide (FFT) pour créer les deux spectres de projections  $P_{+\alpha}$  et  $P_{-\alpha}$ .

$$\begin{aligned} s_{+\alpha}(\text{Re}) + i s_{+\alpha}(\text{Im}) &\xrightarrow{FT} S(\omega_1, +\alpha) = P_{+\alpha} \\ s_{-\alpha}(\text{Re}) + i s_{-\alpha}(\text{Im}) &\xrightarrow{FT} S(\omega_1, -\alpha) = P_{-\alpha} \end{aligned} \quad [13]$$

L'ensemble du traitement, c'est-à-dire la multiplication matricielle suivie par une transformation de Fourier, est aussi appelé une *transformation GFT* <sup>[21]</sup>.

Une manière alternative de reconstruire les spectres de projection consiste à combiner d'abord les composantes de quadrature (Eq. [6]) par paires afin d'obtenir dans le cas d'une expérience  $(n,k)$ -D avec  $n-k=2$  des signaux de type:

$$\begin{aligned}
s_I(t_1, \lambda_Y, \lambda_Z) &= \cos(\lambda_Y \omega_Y t_1) \cos(\lambda_Z \omega_Z t_1) \exp(i \omega_X t_1) \\
s_{II}(t_1, \lambda_Y, \lambda_Z) &= \cos(\lambda_Y \omega_Y t_1) \sin(\lambda_Z \omega_Z t_1) \exp(i \omega_X t_1) \\
s_{III}(t_1, \lambda_Y, \lambda_Z) &= \sin(\lambda_Y \omega_Y t_1) \cos(\lambda_Z \omega_Z t_1) \exp(i \omega_X t_1) \\
s_{IV}(t_1, \lambda_Y, \lambda_Z) &= \sin(\lambda_Y \omega_Y t_1) \sin(\lambda_Z \omega_Z t_1) \exp(i \omega_X t_1)
\end{aligned}
\tag{14}$$

Une transformation de Fourier appliquée à chacun de ces quatre signaux résulte en 4 spectres  $S_{I-IV}(\omega_X, \omega_Y, \omega_Z, \lambda_Y, \lambda_Z)$  comme illustré dans la figure 8. Des combinaisons linéaires de ces 4 spectres donnent finalement les 4 plans de projection recherchés ( $P_I, P_{II}, P_{III}, P_{IV}$ ) avec un pic de corrélation par spectre. Mathématiquement cette opération de combinaison linéaire est décrite par une *transformation Hadamard* (voir sous-chapitre 2.3.2), c'est à dire une multiplication du vecteur ( $S_I, S_{II}, S_{III}, S_{IV}$ ) avec une matrice de Hadamard  $H_4$  (voir Annexe).

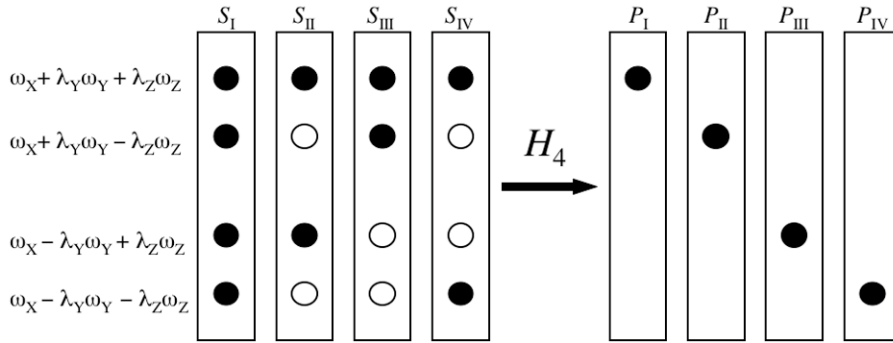


FIGURE 8. Traitement d'une expérience (4,2)-D par transformation de Fourier suivie par une transformation Hadamard.

Les deux méthodes de traitement présentées ci-dessus s'appliquent à toutes les expériences (n,k)-D.

### 2.2.3 Analyse directe des spectres projetés: exploitation des propriétés de symétrie

Dans un spectre 3D H-X-Y classique les coordonnées d'un pic de corrélation correspondent directement aux fréquences ( $\omega_H, \omega_X, \omega_Y$ ) des trois spins H, X, Y couplés entre eux. Pour obtenir cette information d'un spectre (3,2)-D il faut combiner l'information extraite de plusieurs spectres 2D correspondant à différents angles de projections  $\alpha$ . Si la fréquence  $\omega_H$  n'est pas dégénérée, c'est-à-dire un seul pic de corrélation est détecté à cette fréquence  $\omega_H$ , les spectres de projection pour deux angles  $\alpha$  et  $\alpha'$  sont suffisants. Les deux pics de corrélation détectés aux coordonnées ( $\omega_H, \omega_X + \omega_Y \tan \alpha$ ) et ( $\omega_H, \omega_X + \omega_Y \tan \alpha'$ ) permettent de reconstituer le triplet de fréquence ( $\omega_H, \omega_X, \omega_Y$ ) sans ambiguïté. En pratique, il suffit d'enregistrer une expérience (3,2)-D avec un seul facteur d'échelle  $\lambda_Y$  pour reconstruire les deux projections  $P_{+\alpha}$  et  $P_{-\alpha}$ .

En cas de dégénérescence dans le spectre  $^1\text{H}$ , comme cela est souvent observé en RMN des protéines, trois spectres de projection sont au moins nécessaires pour attribuer sans ambiguïté les pics de corrélation à un triplet de noyaux H-X-Y. L'approche la plus courante<sup>[20]</sup> est de combiner l'information d'une paire de projection  $P_{+\alpha}$  et  $P_{-\alpha}$  avec un troisième spectre  $P_0$  ( $\alpha = 0^\circ$ ), appelé



*spectre de pics centraux*. Ce spectre de projection  $P_0$  est l'équivalent d'un spectre 2D H-X standard et ne contient aucune information sur les spins Y. Cependant, l'information des pics centraux est cruciale pour identifier les paires de pics dans les spectres  $P_{+\alpha}$  et  $P_{-\alpha}$  faisant partie du même système de spins couplés H-X-Y. Pour chaque pic central  $(\omega_H, \omega_X)$ , un pic de corrélation est cherché dans chacun des spectres  $P_{+\alpha}$  et  $P_{-\alpha}$  respectant le critère de symétrie suivant: le centre des deux pics doit être à la fréquence  $\omega_1 = \omega_1(0^\circ) = \omega_X$ , et la distance  $\Delta$  des deux pics par rapport au centre doit respecter la relation

$$\Delta = \frac{[\omega_1(+\alpha) - \omega_1(0^\circ)]}{\tan \alpha} = - \frac{[\omega_1(-\alpha) - \omega_1(0^\circ)]}{\tan \alpha} \quad [15]$$

Une fois les deux pics attribués, le paramètre  $\Delta$  de l'équation [15] est une mesure de la fréquence de résonance du spin Y,  $\Delta = \omega_Y$ . Le fait de pouvoir mesurer  $\Delta$  dans les deux spectres  $P_{+\alpha}$  et  $P_{-\alpha}$  augmente la précision de la mesure des fréquences  $\omega_Y$ . Ce protocole d'analyse des spectres (3,2)-D, exploitant les propriétés de symétrie, est illustré dans la figure 9 pour le cas de deux  $^1\text{H}$  ayant la même fréquence  $\omega_H$ .

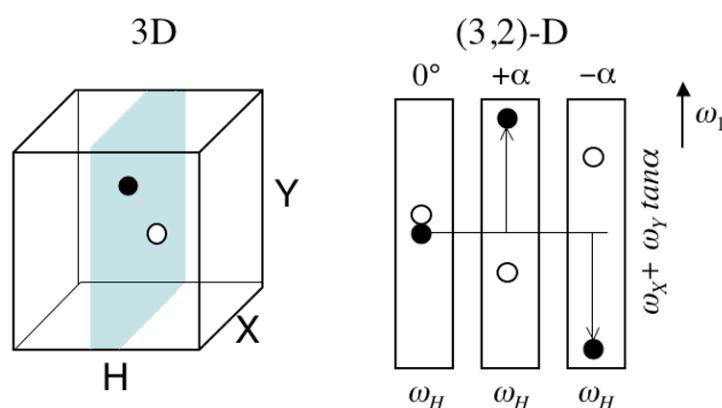


FIGURE 9. Illustration graphique de l'analyse d'un spectre (3,2)-D en exploitant les propriétés de symétrie des deux projections  $P_{+\alpha}$  et  $P_{-\alpha}$  par rapport à un pic central extrait du spectre  $P_0$ .

En pratique, cette recherche de pics symétriques par rapport à un pic central aide surtout pour l'analyse et l'attribution des spectres manuellement en utilisant un programme de visualisation graphique de spectres RMN multidimensionnels. Alternativement, l'analyse des spectres (3,2)-D peut être effectuée d'une manière semi-automatique. Pour cela, les coordonnées des pics de corrélation sont extraites des spectres de projection par un *peak picking*. Un algorithme adapté permet ensuite de trouver toutes les combinaisons de pics respectant le critère de symétrie de l'équation [15]. Cet algorithme développé au laboratoire permet aussi de traiter un plus grand nombre de projections, enregistré à d'autres angles afin de résoudre d'éventuelles ambiguïtés résiduelles.

Un protocole similaire permet d'analyser les spectres (4,2)-D, (5,2)-D, ..., ou plus généralement (n,k)-D. Les pics centraux nécessaires à l'interprétation d'un spectre (4,2)-D H-X-Y-Z par exemple sont obtenus par un spectre 3D ou (3,2)-D H-X-Y. L'information concernant ces

triplets de fréquence  $(\omega_H, \omega_X, \omega_Y)$  peut alors être utilisée pour identifier les spins Z faisant partie du même réseau de spins couplés en utilisant l'équation [15] avec  $\Delta = \omega_Z$  et  $\omega_1(0^\circ) = \omega_X + \lambda_Y \omega_Y$  ou  $\omega_1(0^\circ) = \omega_X - \lambda_Y \omega_Y$  en fonction des projections à traiter (voir figure 8).

#### 2.2.4 Analyse des spectres projetés par reconstruction du spectre multidimensionnel

Alternativement à l'analyse directe d'un spectre multidimensionnel projeté  $(n,k)$ -D, discuté au paragraphe précédent, il est possible de passer par une étape intermédiaire de reconstruction du spectre  $n$ D. La reconstruction d'images 3D à partir d'un jeu de projections 2D est en fait couramment utilisée dans les différentes disciplines d'imagerie et de tomographie. Récemment, E. Kupce et R. Freeman ont montré que cette technique pouvait être aussi utilisé en spectroscopie RMN [23] avec comme objet à reconstruire le spectre  $n$ D. La reconstruction d'image est basée sur une *transformation de Radon inverse* [24] qui dans le cas d'un objet à deux dimensions  $(\omega_X, \omega_Y)$  projetées sur un axe  $\omega_{ilt}(\alpha)$  est donnée par

$$S(\omega_X, \omega_Y) = \int P(\omega_{ilt}(\alpha), \alpha) d\alpha = \int P(\omega_X \cos \alpha + \omega_Y \sin \alpha, \alpha) d\alpha \quad [16]$$

L'intégrale dans l'équation [16] implique que pour reconstruire une image d'un objet caractérisé par une distribution continue du signal  $S(\omega_X, \omega_Y)$  (comme c'est le cas en imagerie anatomique), un très grand nombre de projections est nécessaire. La situation est plus favorable en spectroscopie RMN où l'objet est constitué d'un relativement petit nombre de pics de corrélation entourés d'espace vide (bruit spectral). En conséquence, un nombre restreint de projections peut suffire pour reconstruire le spectre.

En pratique, la reconstruction du spectre  $n$ D à partir d'un jeu de projections se fait en deux étapes distinctes. Nous allons limiter ici la discussion au cas de la reconstruction d'un objet à deux dimensions projetées sur différents axes inclinés. Ce cas correspond à une expérience RMN projetée  $(n,k)$ -D avec  $n-k=1$ . Mais la méthode de reconstruction du spectre  $n$ D par transformation de Radon inverse peut être facilement étendue au cas général d'une expérience projetée  $(n,k)$ -D avec  $n-k \geq 1$  [25].

La première étape consiste à rétroprojeter le spectre 1D de projection  $P_\alpha(\omega_{ilt})$  sur le plan 2D  $(\omega_X, \omega_Y)$  en remplissant le spectre par des intensités:

$$S_\alpha(\omega_X, \omega_Y) = P_\alpha(\omega_X \cos \alpha + \omega_Y \sin \alpha) \quad [17]$$

Cette étape de rétroprojection est illustrée dans la figure 10a. Le principal inconvénient de cette technique est qu'elle induit systématiquement des zones de bruit spectral perpendiculairement à l'axe incliné de la projection.

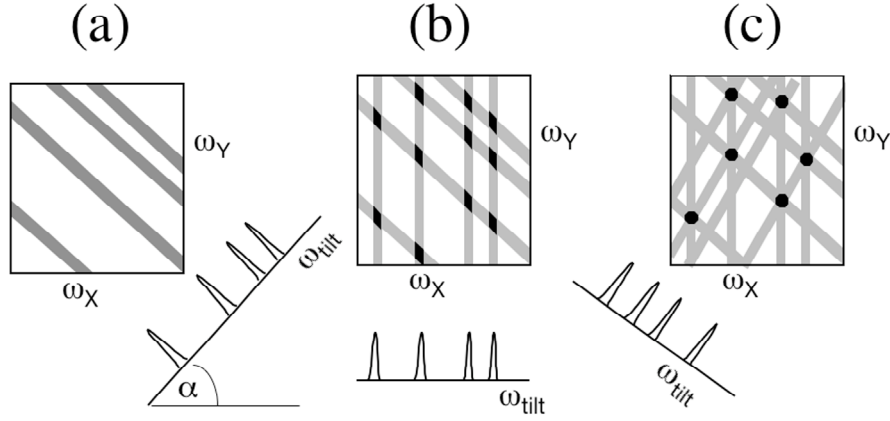


FIGURE 10. Spectre reconstruit à partir de (a) une seule, (b) 2 ou (c) 3 spectres rétroprojetés à partir de différents projections  $P_\alpha$ .

Afin de pouvoir distinguer les pics de corrélation des artéfacts de rétroprojection, plusieurs spectres de projection  $S_\alpha(\omega_X, \omega_Y)$  sont combinés. Dans l'exemple de la figure 10, la combinaison de 3 projections (c) permet de distinguer les 6 "vrais" pics des 5 pics artéfactuels créés par l'utilisation de seulement deux projections (b). Différents algorithmes ont été proposés <sup>[23,25]</sup> pour effectuer cette deuxième étape de reconstruction:

$$(I) \quad S(\omega_X, \omega_Y) = \sum_{\alpha} S_{\alpha}(\omega_X, \omega_Y) \quad [18]$$

$$(II) \quad S(\omega_X, \omega_Y) = \min(S_{\alpha_1}(\omega_X, \omega_Y), S_{\alpha_2}(\omega_X, \omega_Y), \dots) \quad [19]$$

Dans l'algorithme (I), la *somme* de toutes les intensités est calculée pour chacun des points  $(\omega_X, \omega_Y)$ , tandis que pour l'algorithme (II) la *valeur minimale* est retenue pour le spectre final. L'algorithme *somme* présente l'avantage que le rapport S/N dans le spectre reconstruit augmente avec le nombre  $N_p$  de projections additionnés ( $S/N \propto \sqrt{N_p}$ ). Ceci permet notamment de faire sortir un pic du bruit qui n'est pas visible dans les projections individuelles. L'inconvénient de cette méthode est que l'intensité des pics artéfactuels dus à la rétroprojection ne diminue que lentement avec le nombre de projections utilisées. L'algorithme de *valeur minimale*, au contraire, minimise le bruit dans le spectre et fait disparaître très rapidement les artéfacts dus à l'épandage des intensités. Cependant, aucun avantage de sensibilité n'est obtenu par rapport à un spectre de projection, et en conséquence un pic qui ne peut pas être différencié du bruit dans une seule projection ne sera pas non plus visible dans le spectre reconstruit. Une comparaison expérimentale des deux méthodes de reconstruction est montrée dans la figure 11.

Il a aussi été proposé de combiner les deux algorithmes (Eqs. [18] et [19]) de manière à obtenir un compromis entre les avantages et les inconvénients de chacun [26]. Pour cela, l'on calcule d'abord la somme de  $n$  ( $1 \leq n \leq N_p$ ) spectres rétroprojetés  $S_\alpha(\omega_X, \omega_Y)$  en prenant toutes les combinaisons possibles parmi les  $N_p$  spectres. Le résultat est de nouveau un jeu de  $N_p$  spectres qui sont ensuite combinés par la méthode de la valeur minimale. Le rapport S/N d'un spectre ainsi reconstruit augmente avec  $\sqrt{n}$ .

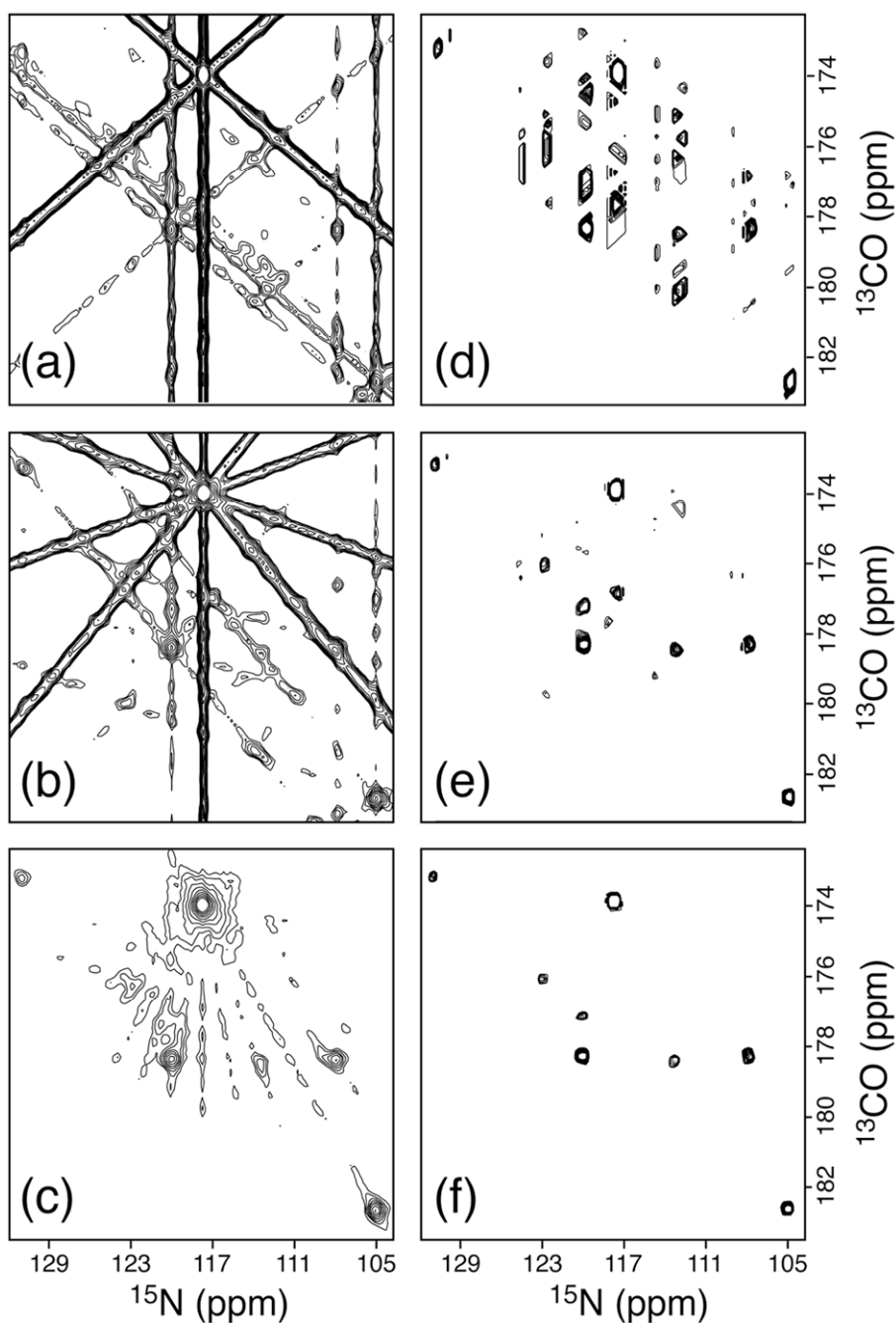


FIGURE 11. Plan N-CO extrait d'un spectre 3D seq-HNCO de MerAa reconstruit à partir d'un jeu de données (3,2)-D en utilisant l'algorithme somme (a-c) ou l'algorithme de la valeur minimale (d-f). Les différents algorithmes ont été implémentés dans un programme en langage C développé au laboratoire (Van Melckebeke et al., non publié). Un nombre différent de projections a été utilisé : 3 pour les spectres (a) et (d), 5 pour (b) et (e), 18 pour (c) et (f). Les niveaux des contours ont été définis de la même manière pour les spectres (a-c) et (d-f) par rapport au pic le plus intense ( $\omega_{CO} \approx 174$  ppm).

### 2.2.5 Comparaison des méthodes d'analyse directe et de reconstruction

La technique de reconstruction du spectre multidimensionnel présente, certes, l'avantage de fournir un spectre familier à l'utilisateur où chaque coordonnée d'un pic de corrélation correspond directement à une fréquence d'un spin nucléaire, alors que dans un spectre de projection, on obtient "seulement" des combinaisons linéaires de différentes fréquences. En

contrepartie, le prix à payer en terme de sensibilité et d'artéfacts dans le spectre  $nD$  peut être élevé : si des spectres ont été enregistrés pour un petit nombre d'angles de projection, les artéfacts dus à l'épandage des intensités lors de la rétroprojection persistent et peuvent rendre difficiles l'analyse du spectre, notamment en cas de grandes variations d'intensité d'un pic à l'autre (voir figure 11). Dans le cas d'un grand nombre de projections et l'utilisation de l'algorithme de la valeur minimale, ces artéfacts peuvent être supprimés efficacement, mais aucun avantage n'est obtenu en terme de sensibilité. L'utilisation de l'algorithme somme, au contraire, permet de bénéficier du signal détecté dans chacun des spectres de projection, mais un grand nombre de projections est nécessaire afin de réduire suffisamment l'intensité des artéfacts dus à la rétroprojection, ce qui augmente le temps d'acquisition minimal de l'expérience.

La méthode d'analyse directe a comme principal avantage qu'aucun artéfact n'est introduit dans le spectre lors du traitement des données. L'inconvénient majeur de cette méthode est qu'une fois un relevé de pics (*peak picking*) a été effectué dans les différents spectres de projection, il reste à combiner les pics faisant partie du même système de spins corrélés. En cas de spectres de projection bien résolus, cette tâche est facilement réalisée par des outils informatiques comme ceux développés au laboratoire. Si deux spectres de projection et un spectre de pics centraux sont suffisants pour une attribution non ambiguë, cette méthode est comparable en terme de sensibilité à une reconstruction du spectre par l'algorithme somme. Des ambiguïtés restantes peuvent être résolues en enregistrant davantage de projections, ou en rajoutant des filtres spectraux (voir sous-chapitre 2.3) pour diminuer le nombre de pics par projection.

En résumé, dans le cas de spectres de projection caractérisés par un petit nombre de pics de corrélation et une bonne dispersion spectrale, l'analyse directe d'un petit nombre de spectres de projection est certainement la méthode la plus sensible, la plus rapide et la plus directe. La reconstruction du spectre  $nD$  devient attractive quand le nombre de superpositions de pics dans les spectres de projection rend un *peak picking* peu fiable, et quand le temps expérimental permet l'acquisition d'un grand nombre de projections. Cela est souvent le cas pour les expériences  $nD$  à dimensionnalité élevée ( $n > 3$ ) appliquées aux molécules de grande taille.

### 2.3 La RMN multidimensionnelle filtrée

Les techniques de la *RMN filtrée* permettent de séparer les pics de corrélation d'un spectre FT-RMN- $nD$  le long d'une seule ou de plusieurs dimensions additionnelles caractérisées chacune par un petit nombre de points  $N_i$ . L'intérêt de ces techniques de filtrage spectral dans le contexte des méthodes d'acquisition rapide réside dans l'ajout d'une dimension d'édition spectrale permettant d'augmenter la résolution du spectre sans pour autant augmenter significativement la durée minimale de l'expérience.

#### 2.3.1 Filtres d'édition spectrale

La manipulation du système de spins par des séquences d'impulsions adaptées permet de réaliser des filtres d'édition spectrale, c'est-à-dire permettant de disperser les pics de corrélation le long d'une dimension additionnelle du spectre (figure 12), afin d'augmenter sa résolution et

d'ajouter de l'information sur le réseau de spins couplés. Les techniques de filtrage spectral ne se limitent pas à l'édition de fréquences de résonance. Des séquences de filtrage peuvent être conçus pour différencier et séparer les pics par rapport à d'autres propriétés du système de spins. Des exemples qui vont nous intéresser dans la suite sont le filtrage des signaux RMN provenant de groupements  $SI_n$  de multiplicité  $n$  différente, ou des filtres séparant les signaux correspondant aux différentes lignes d'un multiplet. Une particularité du filtrage spectral est que la dispersion des pics le long de la dimension du filtre est discrète, c'est-à-dire que le pic n'est pas étalé sur plusieurs points (en fonction de sa largeur de raie), mais uniquement détecté à une seule coordonnée en l'absence d'artéfacts de filtrage.

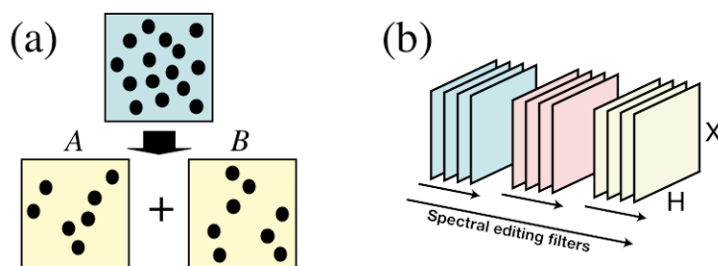


FIGURE 12. (a) principe d'un filtrage spectral: les pics de corrélation 2D sont dispersés sur les deux spectres A et B. (b) Spectre de corrélation  $(2_{cs}+2_{fil})-D$ .

Le concept de filtrage spectral peut être combiné avec la FT-RMN- $nD$  pour enregistrer des spectres à  $(n_{cs}+n_{fil})$  dimensions avec  $n_{cs}$  le nombre de dimensions spectrales standards, et  $n_{fil}$  le nombre de dimensions de filtrage spectral (figure 12b). Il est aussi possible de combiner les deux techniques d'acquisition rapide, la RMN filtrée et la RMN projetée, afin d'enregistrer des spectres de dimensionalité  $((n,k)_{cs}+n_{fil})-D$ . Le tableau 1 résume les différentes notations utilisées dans ce manuscrit :

Notation de l'expérience	Spins édités en fréquence <sup>(a)</sup>	Variables de temps incrémentées <sup>(b)</sup>	Filtres spectraux <sup>(c)</sup>
$nD$	$n$	$n-1$	-
$(n, k)-D$	$n$	$k-1$	-
$(n_{cs}+n_{fil})-D$	$n_{cs}$	$n_{cs}-1$	$n_{fil}$
$((n, k)_{cs}+n_{fil})-D$	$n_{cs}$	$k_{cs}-1$	$n_{fil}$

TABLEAU 1. Notations utilisées pour les expériences de RMN projetée et filtrée. <sup>(a)</sup> nombre de spins corrélés dont la fréquence est éditée d'une manière directe ou indirecte dans le spectre. <sup>(b)</sup> nombre de variables  $t_1, t_2, \dots$  utilisées dans l'expérience pour échantillonner indirectement l'évolution temporelle du système de spins. <sup>(c)</sup> nombre de dimensions obtenues par filtrage spectral permettant de séparer les pics en fonction de certaines propriétés.

### 2.3.2 Spectroscopie Hadamard

La spectroscopie Hadamard est une méthode particulièrement intéressante pour réaliser un filtrage spectral en RMN<sup>[27]</sup>. Contrairement à la FT-RMN où les fréquences de résonance des

spins  $X$  sont échantillonnées dans l'espace temps par une modulation du signal détecté en  $\cos(\omega_x t)$  ou  $\sin(\omega_x t)$ , en spectroscopie Hadamard cette information est obtenue par un codage réalisé directement dans l'espace fréquence. D'une certaine façon, il s'agit de revenir au temps de la RMN où le spectre a été obtenu en balayant les fréquences, une à une par petits pas en répétant l'expérience  $N$  fois. Pour obtenir un gain en sensibilité similaire à la FT-RMN, le spectre est divisé en  $N$  "canaux" ou "bandes de fréquence". Pour chaque répétition de l'expérience le signe des signaux RMN des différentes bandes est changé suivant un schéma de codage donné par une *matrice Hadamard*  $H_N$  <sup>[28]</sup> constituée de +1 et de -1 (voir Annexe).

$$\begin{pmatrix} Exp_1 \\ Exp_2 \\ \dots \\ Exp_N \end{pmatrix} = H_N \begin{pmatrix} B_1 \\ B_2 \\ \dots \\ B_N \end{pmatrix} \quad [20]$$

En pratique, ce codage en (+1) et (-1) est réalisé par des impulsions rf sélectives permettant de manipuler individuellement chacune des  $N$  bandes de fréquence. Bien qu'il soit aussi possible d'utiliser la spectroscopie Hadamard pour enregistrer un spectre 1D, cette technique présente surtout des avantages pour rajouter une ou des dimensions dans une expérience multidimensionnelle. L'inverse de la matrice Hadamard ayant servi à coder l'information spectrale,  $H_N^{-1}$  est ensuite utilisée pour la transformation des données, c'est-à-dire la séparation des signaux correspondant aux différentes bandes le long d'une dimension additionnelle du spectre.

Dans le cas le plus simple de deux bandes  $B_1$  et  $B_2$ , deux spectres sont enregistrés, un premier où tous les signaux ont le même signe ( $B_1+B_2$ ) et un deuxième où les signaux des deux bandes sont de signes opposés ( $B_1-B_2$ ). En additionnant ou soustrayant les deux spectres enregistrés on retrouve les spectres correspondant aux bandes  $B_1$  et  $B_2$ . Cette opération de codage et de décodage peut être représentée par une matrice Hadamard d'ordre 2 (voir Annexe). Des matrices Hadamard  $H_N$  existent pour des ordres  $N=2^j$  ou  $N=4j$  avec  $j$  un nombre entier. Un exemple d'une transformation Hadamard avec  $N=4$  est illustré dans la figure 8 pour le cas du traitement d'un spectre  $(n,k)$ -D avec  $n-k=2$ .

Les principaux atouts de la spectroscopie Hadamard par rapport à la FT-RMN sont les suivants: (i) en absence d'effets de relaxation significatifs pendant la durée des impulsions sélectives, le rapport S/N d'une expérience avec codage Hadamard est le même que pour une expérience sans codage enregistrée dans le même temps expérimental, contrairement à la FT-RMN, où l'ajout d'une dimension indirecte est généralement accompagné d'une perte de sensibilité d'un facteur  $\sqrt{2}$  (Eq. [2]) . (ii) La spectroscopie Hadamard permet de limiter les points enregistrés dans la dimension indirecte à un petit nombre ( $N=2, 4, 8, \dots$ ), contrairement à la FT-RMN où l'échantillonnage uniforme du signal temporel impose un nombre minimal de points nettement plus élevé afin d'obtenir une résolution spectrale satisfaisante. Cependant, la spectroscopie Hadamard ne présente un avantage de temps par rapport à la FT-RMN que si le nombre de bandes à manipuler est plus petit que le rapport largeur spectrale (SW) sur largeur de raie ( $\Delta\nu$ ).

$$N < \frac{SW}{\Delta\nu} \quad [21]$$

En contrepartie, la spectroscopie Hadamard est sensible aux imperfections des impulsions sélectives, qui diminuent l'efficacité du filtrage.

En RMN biomoléculaire, le nombre de résonances dans un spectre est souvent considérablement plus élevé que le rapport  $SW/\Delta\nu$ . Deux solutions existent alors pour limiter le nombre de bandes: (i) on se focalise sur un petit nombre de résonances préalablement identifiées faisant partie du site actif de la molécule ou de la zone d'interaction avec un partenaire moléculaire, et chaque spin nucléaire sélectionné est traité comme une bande à part (*frequency-selective Hadamard*)<sup>[27]</sup>, (ii) on divise le spectre dans un petit nombre de bandes contenant chacune une multitude de résonances. Dans ce cas (*band-selective Hadamard*)<sup>[29]</sup>, l'information de fréquence à l'intérieur de chaque bande est perdue.

## 2.4 La RMN multidimensionnelle en une seule acquisition

Les différentes méthodes d'acquisition rapide présentées dans les chapitres précédents ont été conçues pour réduire le nombre de points échantillonnés dans les dimensions indirectes d'une expérience multidimensionnelle. Autrement dit, elles limitent le nombre de répétitions d'une expérience RMN-1D pour accéder à des temps expérimentaux qui varient entre quelques minutes et quelques heures en fonction de l'expérience et de la méthode utilisées. Ainsi, en exploitant ces méthodes d'acquisition rapide, on passe aujourd'hui pour la quasi-totalité des expériences en RMN biomoléculaire d'un régime où le temps d'acquisition est principalement limité par l'échantillonnage de l'espace temporel à un régime où le temps d'acquisition est uniquement déterminé par la sensibilité de l'expérience.

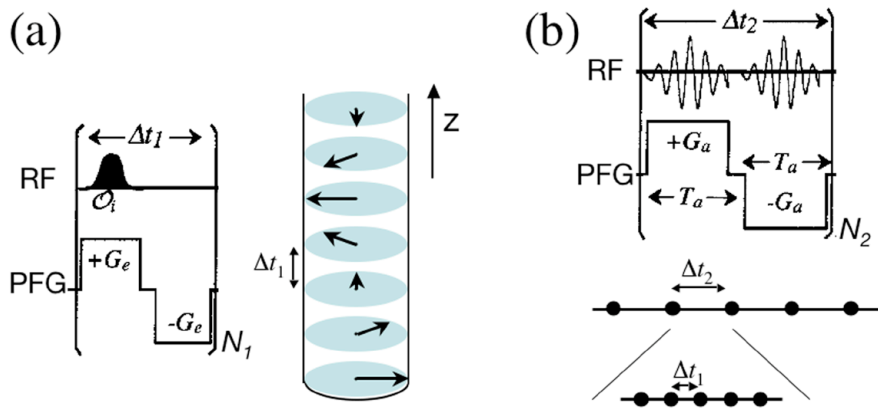


FIGURE 13. Illustrations schématiques d'une expérience d'acquisition ultrarapide 2D [30] : (a) phase de préparation des spins, et (b) détection du signal.

Un concept original, très différent des méthodes d'acquisition rapide présentées jusqu'ici, a récemment été développé par Lucio Frydman et collaborateurs<sup>[30]</sup>. Cette méthode d'acquisition ultrarapide s'inspire d'une technique d'imagerie par Résonance Magnétique (IRM), appelée *echo planar imaging* (EPI) pour échantillonner les différentes dimensions d'une expérience



multidimensionnelle lors de la détection du signal, c'est-à-dire dans une seule acquisition. L'idée de base de cette méthode d'acquisition ultrarapide est d'utiliser un axe de l'espace (x, y, z) pour coder l'évolution temporelle des spins pendant un temps  $t_1$  (figure 13a). Pour cela l'échantillon est divisé en  $N_1$  "zones" le long d'un axe de l'espace (par exemple l'axe z), et un gradient de champ magnétique  $G_z$  est appliqué le long de cet axe. En présence de ce gradient de champ, les spins des différentes tranches de l'échantillon vont résonner dans des plages fréquentielles distinctes, ce qui permet leur manipulation par bandes de fréquence en utilisant des impulsions rf sélectives, similaire à la spectroscopie Hadamard (sous-chapitre 2.3.2). Une séquence d'impulsions rf et de gradients de champs pulsés adaptée permet alors de préparer le système dans un état correspondant à une évolution libre des spins pendant un délai  $t_1 = n\Delta t_1$ , avec  $n$  un nombre entier ( $0 \leq n \leq N_1$ ) différent pour chacune des  $N_1$  zones spatiales (figure 13a). Ceci revient à créer un FID discret de  $N_1$  points le long de l'axe z. Ce FID peut ensuite être *imagé* par une des techniques d'IRM. La technique EPI<sup>[31]</sup> permet d'échantillonner ce FID le long de l'axe z en même temps que la détection finale du signal ( $t_2$ ) en créant des échos de spins entre deux points consécutifs d'échantillonnage  $t_2$ , détectés par un deuxième échantillonnage de pas  $\Delta t_1$  (figure 13b). Entre les phases de préparation et de détection, des séquences conventionnelles de transfert de polarisation (ou de cohérence) entre les spins peuvent être utilisées pour faire interagir les spins afin de détecter des pics de corrélation dans le spectre 2D.

Un exemple d'un spectre de corrélation 2D obtenu par cette technique est montré dans la figure 14.

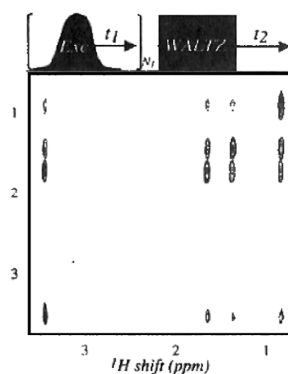


FIGURE 14. Spectre 2D  $^1\text{H}$ -TOCSY d'un échantillon concentré (20% v/v) de *n*-butylchloride enregistré en moins de 1s utilisant la technique d'acquisition ultrarapide [30a].

Les techniques d'acquisition ultrarapide ont potentiellement des applications très intéressantes, notamment pour la caractérisation de phénomènes cinétiques en temps réel, ou pour l'acquisition d'un spectre d'un système de spins hors équilibre thermodynamique, comme après une polarisation par pompage optique ou par DNP<sup>[32]</sup>. Bien qu'aujourd'hui la sensibilité de la plupart des expériences RMN appliquées aux échantillons biomoléculaires ne soit pas suffisante pour des temps expérimentaux de l'ordre de la seconde, des avancées techniques ou spectroscopiques futures pourraient changer cette situation.

### 3 Expériences pour l'attribution rapide $^1\text{H}$ , $^{13}\text{C}$ , et $^{15}\text{N}$ des protéines

L'attribution des fréquences de résonance aux noyaux  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ , et  $^{15}\text{N}$  de la protéine constitue la première étape et la base de toute étude structurale ou dynamique par RMN. Les différents noyaux ainsi caractérisés par leurs fréquences de résonance fournissent des sondes locales au sein de la protéine qui à travers de nombreux paramètres RMN donnent accès aux informations recherchées sur la structure et la dynamique de la molécule, ou sur les zones d'interaction avec ses partenaires moléculaires.

#### 3.1 Attribution séquentielle de la chaîne principale

##### 3.1.1 Stratégie d'attribution d'une protéine enrichie uniformément en $^{13}\text{C}$ et $^{15}\text{N}$

L'attribution séquentielle est basée sur une série d'expériences permettant de corréler les noyaux  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ , et  $^{15}\text{N}$  le long de la chaîne peptidique *via* les couplages scalaires ( $J$ ) à une ou deux liaisons (figure 15).

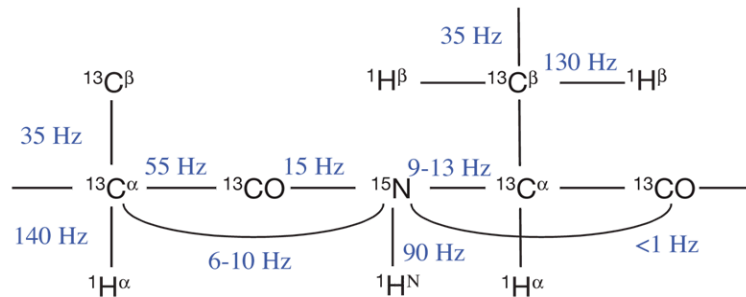


FIGURE 15. Couplages scalaires  $^1J$  et  $^2J$  dans une chaîne peptidique.

Théoriquement, cette stratégie pourrait permettre de corréler des noyaux tout le long de la chaîne peptidique. Cependant, les effets de relaxation de spin réduisent l'efficacité des transferts et limitent le nombre de spins nucléaires pouvant être corrélés dans une même expérience. En pratique, 3 ou 4 noyaux sont corrélés et leurs fréquences de résonance éditées dans une expérience RMN multidimensionnelle. Les triplets ou quadruplets de fréquences extraits de ces spectres correspondent à des enchaînements de noyaux ("blocs") dans la séquence peptidique. Ces blocs sont ensuite combinés pour reconstruire l'ensemble de l'enchaînement de la chaîne peptidique en exploitant le fait que les différents blocs se superposent partiellement (Figure 16).

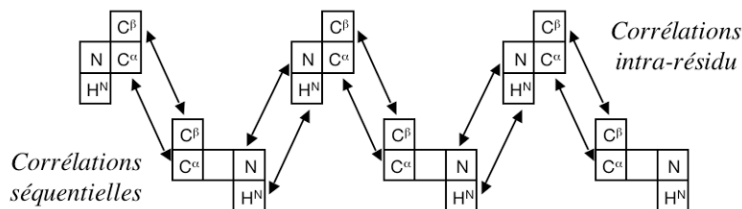


FIGURE 16. Exemple d'enchaînement de blocs de fréquences extraits des expériences de corrélation H-N-X ou H-N-X-Y pour l'attribution séquentielle de la chaîne peptidique.

Plus les fréquences de résonance sont dégénérées, plus il est important de corrélérer un nombre élevé de spins dans la même expérience afin de lever les ambiguïtés d'enchaînement de blocs.

### 3.1.2 Expériences (3,2)-D H-N-X unidirectionnelle pour l'attribution de petites protéines

Dans la stratégie d'attribution la plus courante des paires d'expériences de corrélation H-N-X ou H-N-X-Y, avec X et Y un des noyaux  $C^\alpha$ ,  $C^\beta$ ,  $H^\alpha$ , ou CO sont enregistrées, pour corrélérer les fréquences du groupement amide  $H^N(i)$  et  $N(i)$  avec les fréquences X (et Y) du même résidu (i) ou du résidu précédent (i-1). Toutes ces expériences impliquent un transfert  $N \rightarrow C^\alpha$ . Les différentes séquences d'impulsions, montrées dans la figure 17, permettent de réaliser un transfert  $N \rightarrow C^\alpha$  bidirectionnel, séquentiel, ou intra-résidu.

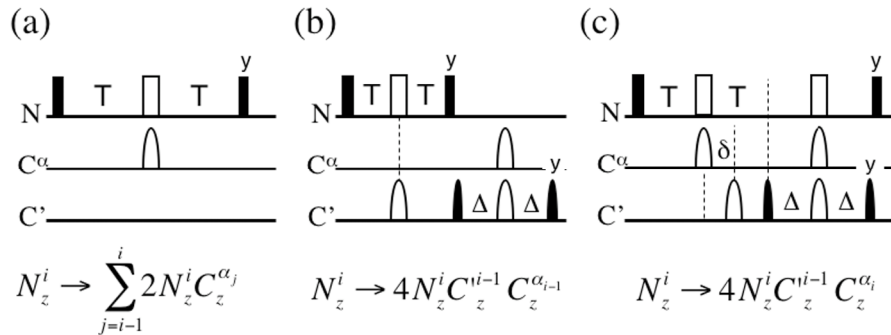


FIGURE 17. Séquences d'impulsions pour un transfert  $N \rightarrow C^\alpha$  (a) bidirectionnel, (b) séquentiel, ou (c) intra-résidu. Les délais de transfert sont ajustés à  $\Delta = 1/4J_{C^\alpha C^\alpha} \approx 4.5\text{ms}$ , (a)  $T = 1/8J_{NC^\alpha} \approx 12\text{ms}$ , (b)  $T = 1/4J_{NC^\alpha} \approx 17\text{ms}$ , (c)  $T = 1/4J_{NC^\alpha} - \Delta \approx 17 - 21\text{ms}$ ,  $T - \delta = 1/4J_{NC^\alpha} \approx 17\text{ms}$ .

Dans le cas le plus simple d'une séquence INEPT  $N \rightarrow C^\alpha$  (Fig. 17a) la polarisation  $^{15}\text{N}$  est transférée à la fois sur le  $C^\alpha$  du même résidu et du résidu précédent, grâce aux constantes de couplages  $^1J_{NC^\alpha}$  et  $^2J_{NC^\alpha}$  similaires (voir Figure 15). Deux pics de corrélation sont alors détectés par résidu dans le spectre final. Un transfert  $N \rightarrow C^\alpha$  purement séquentiel peut être réalisé par un transfert relais  $N(i) \xrightarrow{^1J_{NC^\alpha}} \text{CO}(i-1) \xrightarrow{^1J_{C^\alpha C^\alpha}} C^\alpha(i-1)$  (Fig. 17b). Ceci est possible car le couplage  $^2J_{NC^\alpha}$  est négligeable. Jusqu'à récemment aucune séquence n'était disponible pour limiter le transfert  $N \rightarrow C^\alpha$  à l'intérieur d'un même résidu. Nous avons alors développé [33] une nouvelle séquence montrée dans la Fig. 17c, qui permet de réaliser un tel transfert  $N \rightarrow C^\alpha$  intra-résidu. Cette séquence est basée sur une suite de deux transferts de cohérence : d'abord une cohérence  $N_x^i$  évolue sous l'effet simultané des 3 couplages  $^1J_{NC^\alpha}$ ,  $^1J_{NC^\alpha}$  et  $^2J_{NC^\alpha}$ , créant ainsi une cohérence  $8N_y^i C_z^{i-1} C_z^{\alpha_i} C_z^{\alpha_{i-1}}$ . Ensuite, une impulsion  $90^\circ$  est appliquée sur les spins  $^{13}\text{C}'$ , suivie par l'évolution du couplage  $^1J_{C' C^\alpha}$  pendant un délai  $2\Delta = 1/2J_{C' C^\alpha}$ . Finalement, aucune polarisation n'a été transférée sur les spins  $C^\alpha(i-1)$ .

La figure 18 illustre l'efficacité de la nouvelle séquence  $N \rightarrow C^\alpha$  intra-résidu d'un point de vue théorique et expérimental. L'intensité d'éventuels pics de corrélation séquentiels résiduels est inférieure à 10% (dans le pire des cas) de celle du pic de corrélation intra-résidu. L'efficacité du

transfert dépend du résidu, à cause de la variation des couplages  $^1J_{NC^\alpha}$  et  $^2J_{NC^\alpha}$  d'un site à l'autre. En général, le transfert est plus efficace pour les résidus en feuillet- $\beta$  avec des constantes de couplages moyennes  $^1J_{NC^\alpha} \approx 10.9\text{Hz}$  et  $^2J_{NC^\alpha} \approx 8.3\text{Hz}$ , et moins efficace pour les résidus en hélice- $\alpha$  ( $^1J_{NC^\alpha} \approx 9.6\text{Hz}$  et  $^2J_{NC^\alpha} \approx 6.4\text{Hz}$ ).

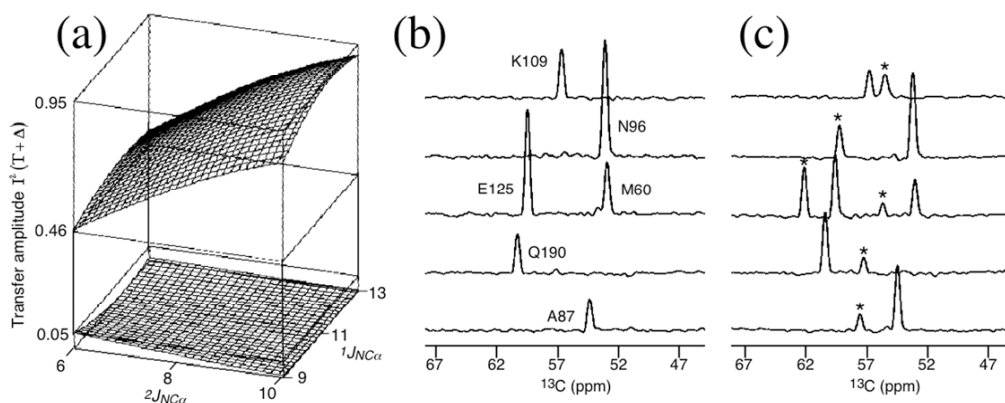


FIGURE 18. (a) amplitudes de transfert  $N \rightarrow C^\alpha$  utilisant la séquence de la figure 17c avec  $T+\Delta=43\text{ms}$  [33a]. Les courbes sont calculées pour les corrélations intra-résidu (grille supérieure) et séquentielles (grille inférieure) en fonction des constantes de couplage  $J_{NC^\alpha}$ . Les effets de relaxation n'ont pas été pris en compte pour le calcul. (b) et (c) traces 1D  $^{13}\text{C}$  extraites d'une expérience (b) intra-HNCA et (c) HNCA bidirectionnelle de la protéine SiR-FP18. Une étoile dans le spectre (c) indique un pic de corrélation séquentielle.

Une expérience H-N-X ou H-N-X-Y basée sur un transfert de polarisation  $N \rightarrow C^\alpha$  unidirectionnel présente un cas idéal pour l'application des méthodes d'acquisition rapide. Un seul pic de corrélation est détecté par résidu, à l'exception des prolines qui n'ont pas de  $^1\text{H}$  amide. En conséquence une grande partie de l'espace spectral 3D ou 4D ne contient pas d'information sur la molécule, mais uniquement du bruit. La sensibilité de ces expériences est généralement suffisante pour que le temps d'acquisition d'un spectre 3D soit déterminé par les contraintes d'échantillonnage des dimensions indirectes du spectre, et non par le rapport S/N. Nous avons mis au point une série de 6 expériences (3,2)-D H-N-X [34], 3 expériences *séquentielles* (*seq*-HNX) et 3 *intra-résidu* (*intra*-HNX), où les fréquences N et X ( $C^\alpha$ ,  $C^\beta$ , ou  $H^\alpha$ ) sont projetées sur un axe incliné comme expliqué au sous-chapitre 2.2. Les séquences d'impulsions, montrées dans la figure 19, ont été optimisées en termes de sensibilité, notamment en utilisant une séquence de mélange planaire [35] pour le dernier transfert  $^{15}\text{N} \rightarrow ^1\text{H}$ , et des impulsions sélectives pour contrôler le chemin de cohérence des spins  $^1\text{H}$  des molécules d'eau afin qu'ils soient retournés dans leur état d'équilibre thermodynamique avant la détection finale [36]. Ceci diminue le temps de retour à l'équilibre des  $^1\text{H}$  amides et permet d'utiliser des délais de recyclage plus courts entre deux acquisitions.

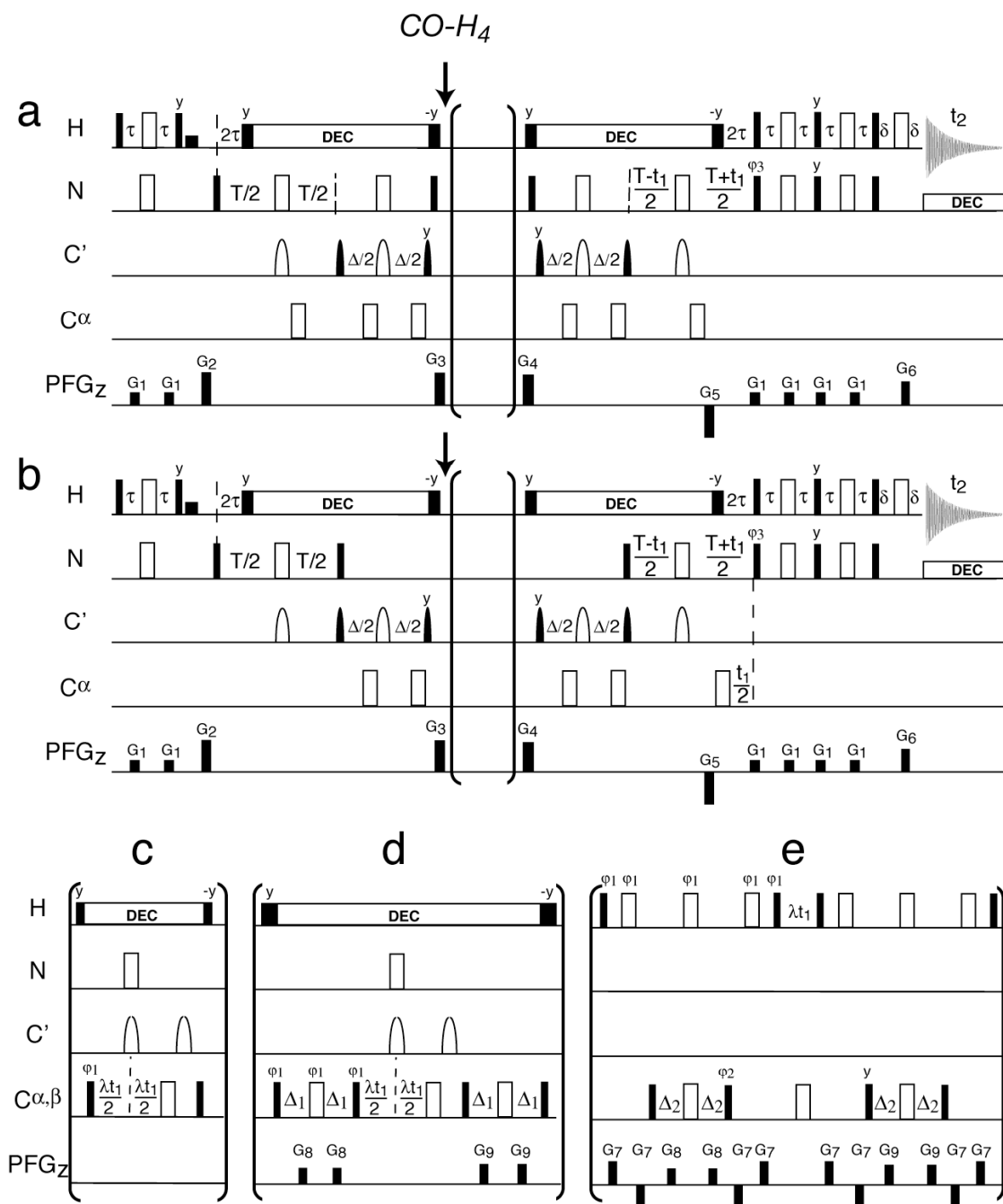


FIGURE 19. Séquences d'impulsions pour les expériences (3,2)-D (a) intra-HNX et (b) seq-HNX. Une série de 6 expériences est générée en insérant un des blocs (c)  $X = C^\alpha$ , (d)  $X = C^\beta$ , ou (e)  $X = H^\alpha$  dans les séquences (a) ou (b). S'il n'y a pas de phase spécifiée les impulsions  $90^\circ$  (noir) et  $180^\circ$  (blanc) sont appliquées le long de l'axe  $x$ . Les délais de transfert sont ajustés à  $\tau = 1/4J_{NH}$ ,  $T = 1/2J_{NC}$ ,  $\Delta = 1/2J_{CC'}$ ,  $\Delta_1 = 1/4J_{CC'}$ , et  $\Delta_2 = 1/4J_{C'H'}$ . La durée relative des gradients  $G_5$  et  $G_6$  est donnée par le rapport  $G_5/G_6 = \gamma_H/\gamma_N$ . Pour les 4 composantes de quadrature par incrément  $t_1$  les phases suivantes sont utilisées: (I)  $\varphi_1 = x$ ,  $\varphi_3 = x$ , (II)  $\varphi_1 = y$ ,  $\varphi_3 = x$ , (III)  $\varphi_1 = x$ ,  $\varphi_3 = -x$ , (IV)  $\varphi_1 = y$ ,  $\varphi_3 = -x$ . En plus le signe du gradient  $G_5$  est changé pour les expériences (II) et (IV). Plus de détails expérimentaux peuvent être trouvés dans la référence [34]. La flèche en (a) et (b) indique l'endroit d'insertion d'un filtre d'édition spectrale CO-H<sub>4</sub> afin d'enregistrer des spectres ((3,2)+1)-D HNX (voir sous-chapitre 3.1.3)

Le temps caractéristique de ces expériences, c'est-à-dire le temps nécessaire à l'enregistrement d'une paire de spectres de projection avec une résolution optimale, est de l'ordre de 10-20min. Un exemple d'une expérience (3,2)-D *seq*-HNCA, enregistrée en 20min sur la protéine MerAa (67 résidus), est montré dans la figure 20.

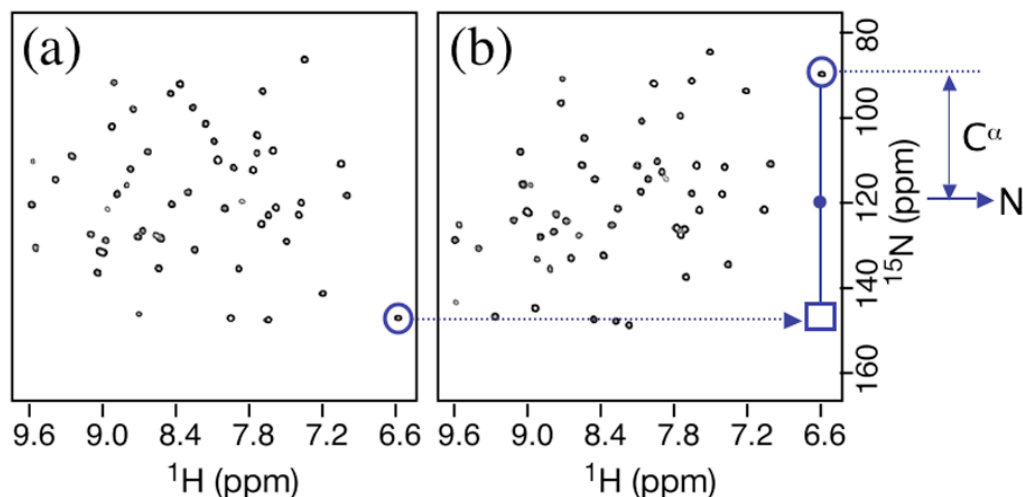


FIGURE 20. Spectres de corrélation (3,2)-D *seq*-HNCA de MerAa ( $\approx 1.5\text{mM}$ ) enregistré à 600MHz (25°C). (a)  $\alpha=45^\circ$ , (b)  $\alpha=-45^\circ$ . Temps expérimental: 20min.

Pour les protéines de petite taille (<100 résidus) il est généralement suffisant d'enregistrer deux projections par expérience pour attribuer sans ambiguïtés les spectres, c'est-à-dire combiner les pics des différentes projections afin de calculer les triplets de fréquences (H, N, X). Le même spectre de corrélation  $^1\text{H}-^{15}\text{N}$  HSQC permet d'obtenir l'information des *pics centraux* nécessaire pour l'analyse des spectres de projection suivant la méthode décrite au sous-chapitre 2.2.3. Un facteur d'échelle  $\lambda_x$  (ou angle de projection  $\alpha$ ) adapté à la largeur de raie des noyaux  $X = \text{C}^\alpha, \text{C}^\beta$ , ou  $\text{H}^\alpha$  permet d'optimiser au mieux la résolution et la sensibilité des expériences. Avec ces nouvelles séquences d'impulsions (3,2)-D, le temps d'acquisition d'un jeu complet de spectres, permettant l'attribution séquentielle de la chaîne principale, est réduit de quelques jours à quelques heures <sup>[34]</sup>.

### 3.1.3 Application aux protéines de plus grande taille: expériences ((3,2)+1)-D H-N-X

Avec le nombre croissant de résidus dans une protéine de taille élevée, la dégénérescence des fréquences de résonance augmente, notamment vers le centre du spectre. Les conséquences majeures pour les expériences de projection (3,2)-D sont l'apparition de plus en plus de superpositions de pics dans les spectres 2D, et la difficulté d'extraire l'information de fréquences corrélées (H,N,X) à partir d'un petit nombre de projections. Alors que le deuxième problème peut être résolu en enregistrant d'avantage de spectres 2D à différents angles de projection, ceci ne permet pas de résoudre des ambiguïtés liées à la superposition de certains pics de corrélation  $^1\text{H}-^{15}\text{N}$ .

Une solution, permettant de s'affranchir des deux problèmes cités ci-dessus, pourrait être de simplifier le spectre de corrélation  $^1\text{H}-^{15}\text{N}$  afin qu'il ressemble de nouveau au spectre d'une petite protéine, c'est-à-dire un spectre avec un petit nombre de pics (<100) et peu de superpositions. Une telle simplification du spectre est faisable en exploitant une propriété, jusqu'ici inutilisée, des séquences de corrélation *intra*-HNX et *seq*-HNX de la figure 19. Dans les deux cas, les spins  $\text{CO}(i-1)$  sont polarisés au cours de l'expérience en forme d'un état de spin de type  $8N_z^i C_z^{i-1} C_z^{\alpha_j} X_z^j$  avec  $j = i$  (*intra*) ou  $j = i-1$  (*seq*) pour les séquences *intra*-résidu et séquentielle, respectivement (voir aussi figure 17). Ceci permet un filtrage spectral basé sur un codage Hadamard du spectre  $^{13}\text{CO}$  qui disperse les pics de corrélation le long d'une dimension additionnelle ( $\text{CO}-H_N$ ) contenant  $N$  points (voir sous-chapitre 2.4). Ce filtrage spectral bénéficie de la faible corrélation généralement observée dans les protéines entre les fréquences  $^{15}\text{N}$  et  $^{13}\text{C}$ , ainsi qu'entre  $^1\text{H}^N$  et  $^{13}\text{C}$ . Nous avons implémenté un tel filtre ( $\text{CO}-H_4$ ) dans les expériences H-N-X unidirectionnelles permettant d'enregistrer des spectres à  $((3,2)+1)$  dimensions <sup>[37]</sup>. Pour cela, le spectre  $^{13}\text{CO}$  est divisé en 4 bandes de largeurs différentes, afin de prendre en compte le fait que la densité des spins résonnants dans une certaine bande de fréquences décroît du centre vers l'extérieur du spectre (Figure 21a).

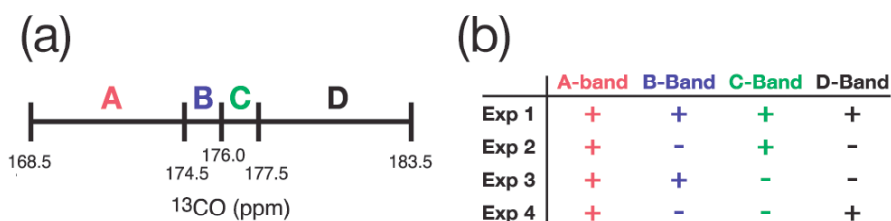


FIGURE 21. (a) division du spectre  $^{13}\text{CO}$  en différentes bandes A-D. (b) schéma d'acquisition pour un filtre  $\text{CO}-H_4$  par codage Hadamard.

Pour réaliser un filtre  $\text{CO}-H_4$ , l'expérience est répétée 4 fois avec différentes bandes  $^{13}\text{CO}$  inversées par une impulsion sélective suivant le schéma de la figure 21b, donné par la matrice Hadamard d'ordre 4 ( $H_4$ ). Pour les expériences (Exp 3) et (Exp 4) l'inversion est réalisée par une seule impulsion sélective centrée par rapport aux deux bandes C-D et B-C, respectivement. Ceci réduit les artéfacts liés aux imperfections des impulsions sélectives aux bords de la zone d'inversion. Pour l'expérience (Exp 2) les deux impulsions d'inversion des bandes B et D sont combinées par addition vectorielle <sup>[38]</sup>. Une application du filtre  $\text{CO}-H_4$  à la protéine SiR-FP18 (167 résidus) est montrée dans la figure 22.

Les spectres 1D de la figure 22a montrent la bonne séparation des différentes bandes réalisée par le filtre  $\text{CO}-H_4$ . Cependant, il faut noter que pour des résidus dont la fréquence  $^{13}\text{CO}$  est à la frontière de deux bandes, un pic est détecté dans les spectres correspondant à chacune des deux bandes.

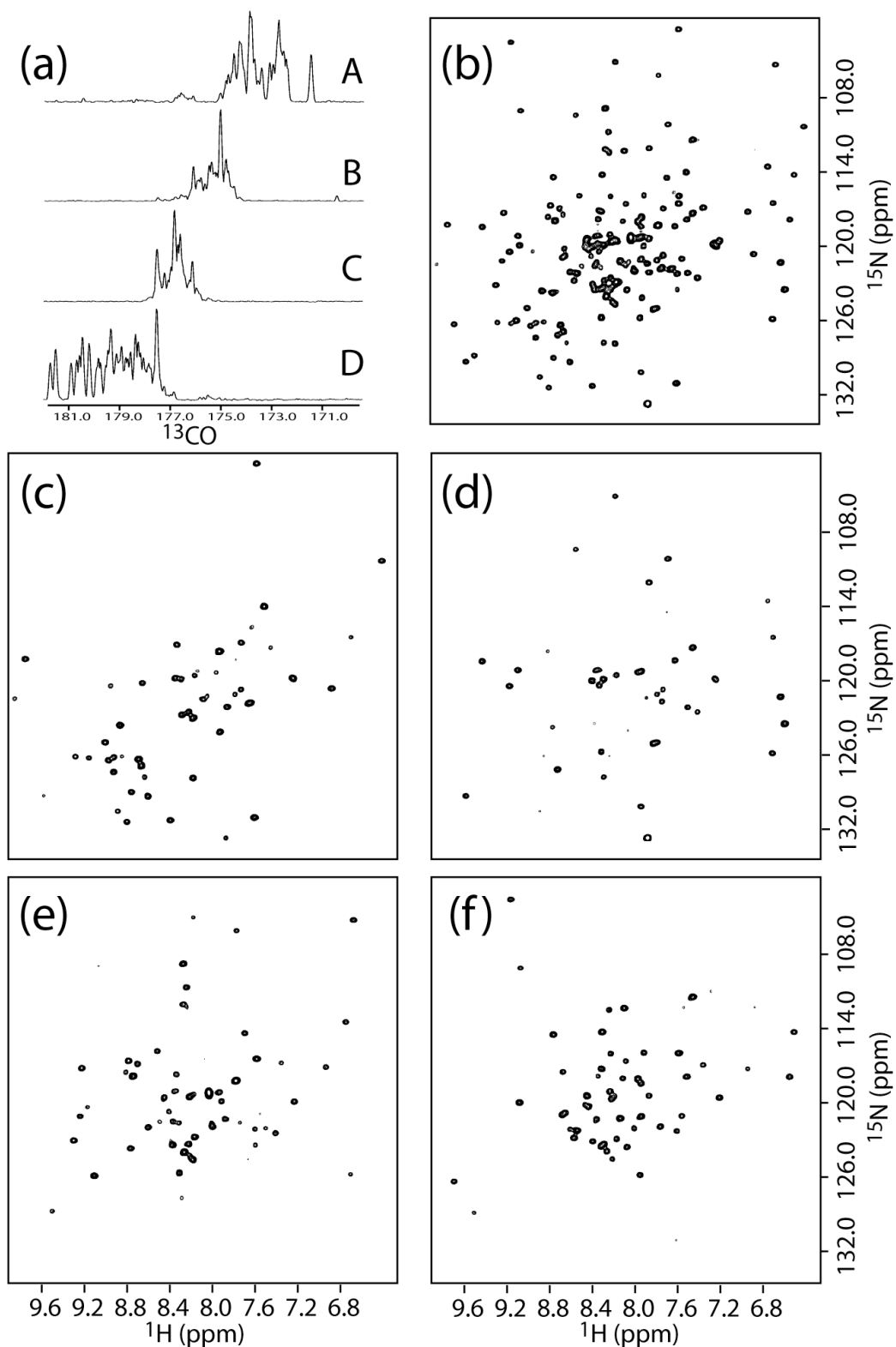


FIGURE 22. Filtre d'édition spectrale  $\text{CO-H}_4$  appliqué à un échantillon de SiR-FP18 (167 résidus). Tous les spectres ont été enregistrés à 600MHz (30°C). (a) spectres  $1\text{D } ^{13}\text{CO}$  illustrant la performance du filtre à séparer les 4 bandes. (b) Spectre de corrélation  $^1\text{H-}^{15}\text{N}$  standard. (c-f) Spectres de corrélation  $^1\text{H-}^{15}\text{N}$  extraits d'un spectre (2+1)-D le long de la dimension du filtre  $\text{CO-H}_4$  correspondant aux bandes A, B, C, et D, respectivement.



Comme attendu, le filtre CO- $H_4$  réduit considérablement la complexité du spectre de corrélation  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  en termes de nombre de signaux et de superpositions. Chaque spectre 2D contient moins de 50 pics de corrélation, avec une bonne dispersion dans le spectre. Ceci indique clairement que la même stratégie d'attribution basée sur une série d'expériences (3,2)-D H-N-X est applicable aux protéines de taille plus élevée en ajoutant un filtre CO- $H_4$  dans les séquences de la figure 19 permettant d'enregistrer des spectres ((3,2)+1)-D H-N-X. Ceci a pu être démontré expérimentalement dans le cas de la protéine SiR-FP18 <sup>[37]</sup>.

### 3.1.4 Attribution séquentielle rapide de protéines deutérées

La sensibilité des expériences de corrélation diminue très vite quand la taille de la molécule augmente à cause d'une relaxation transversale plus efficace. Afin de réduire les pertes de signal au cours de la séquence d'impulsions dues à la relaxation des spins, on remplace les protons aliphatiques et aromatiques (non-échangeables avec le solvant) de la protéine par des deutérons <sup>[39]</sup>. Cette substitution atomique diminue l'efficacité de la principale source de relaxation des  $^{13}\text{C}$  aliphatiques, l'interaction dipolaire  $^{13}\text{C}$ - $^1\text{H}$  d'un facteur  $(\gamma_H/\gamma_D)^2 \approx 45$ . Cependant, un inconvénient de la deutération est qu'elle réduit considérablement le nombre de sondes RMN (spins nucléaires avec  $S=1/2$ ) dans la molécule. Bien que les deutérons aient un spin  $S=1$  qui les rend, en principe, observable en RMN, le manque de dispersion du spectre  $^2\text{H}$  et une relaxation transversale rapide empêche leur utilisation dans les expériences de corrélation.

Aujourd'hui, la deutération partielle ou complète des sites  $^1\text{H}$  non-échangeables est une technique couramment utilisée pour des protéines excédant une taille d'environ 150 résidus. Elle permet notamment d'augmenter la sensibilité des expériences de corrélation de type H-N-X ou H-N-X-Y utilisées pour l'étape d'attribution séquentielle. Les séquences de corrélation séquentielle et intra-résidu HNCA et HNCB de la figure 19, avec ou sans filtre CO- $H_4$ , peuvent alors aussi être utilisées pour l'attribution de protéines deutérées. En pratique, notamment pour des applications à haut champ magnétique, des séquences légèrement modifiées par rapport à celles de la figure 19 sont utilisées afin de minimiser les pertes de signal pendant les transferts  $^{15}\text{N} \rightarrow ^{13}\text{C}$ , en exploitant un effet de relaxation par corrélation croisée entre l'interaction dipolaire  $^{15}\text{N}$ - $^1\text{H}$  et la partie anisotrope du déplacement chimique  $^{15}\text{N}$ . Cet effet est aujourd'hui connu sur le nom de TROSY <sup>[6a]</sup>. A cause de l'absence des  $^1\text{H}$  aliphatiques dans une protéine deutérée, les deux expériences de corrélation *intra*-HNHA et *seq*-HNHA de la figure 19 ne peuvent plus être utilisées. Elles seront remplacées par la paire d'expériences *intra*-HNCO et *seq*-HNCO dont les séquences d'impulsions sont montrées dans la figure 23. Alors que la séquence de l'expérience (3,2)-D *seq*-HNCO est dérivée d'une expérience 3D HNCO standard, l'expérience *intra*-HNCO <sup>[40]</sup> est basée sur un chemin de transfert de cohérence unidirectionnel original. Afin de réaliser un transfert N $\rightarrow$ CO intra-résidu, d'abord une cohérence  $8N_y^i C_z^{i-1} C_z^{\alpha_i} C_z^{\alpha_{i-1}}$  est créée similaire au transfert N $\rightarrow$ C $^\alpha$  intra-résidu de la figure 17c. Ensuite, un transfert de type  $C_z^{i-1} C_x^{\alpha_i} C_x^{\alpha_{i-1}} \xrightarrow{J_{C'C^\alpha}} C_y^{\alpha_i} C_y^{\alpha_{i-1}} C_z^i$  permet de polariser les

$^{13}\text{C}$  en position (i) afin de pouvoir éditer leurs fréquences de résonance. La deutération de la protéine est particulièrement importante pour l'expérience *intra*-HNCO qui contient une période d'évolution d'environ 30ms d'une cohérence comportant un terme  $C_x^{\alpha_i} C_x^{\alpha_{i-1}}$ . La deutération supprime la principale source de relaxation d'une telle cohérence, les interactions dipolaires  $^{13}\text{C}$ - $^1\text{H}$ , permettant ainsi son application aux protéines de taille élevée.

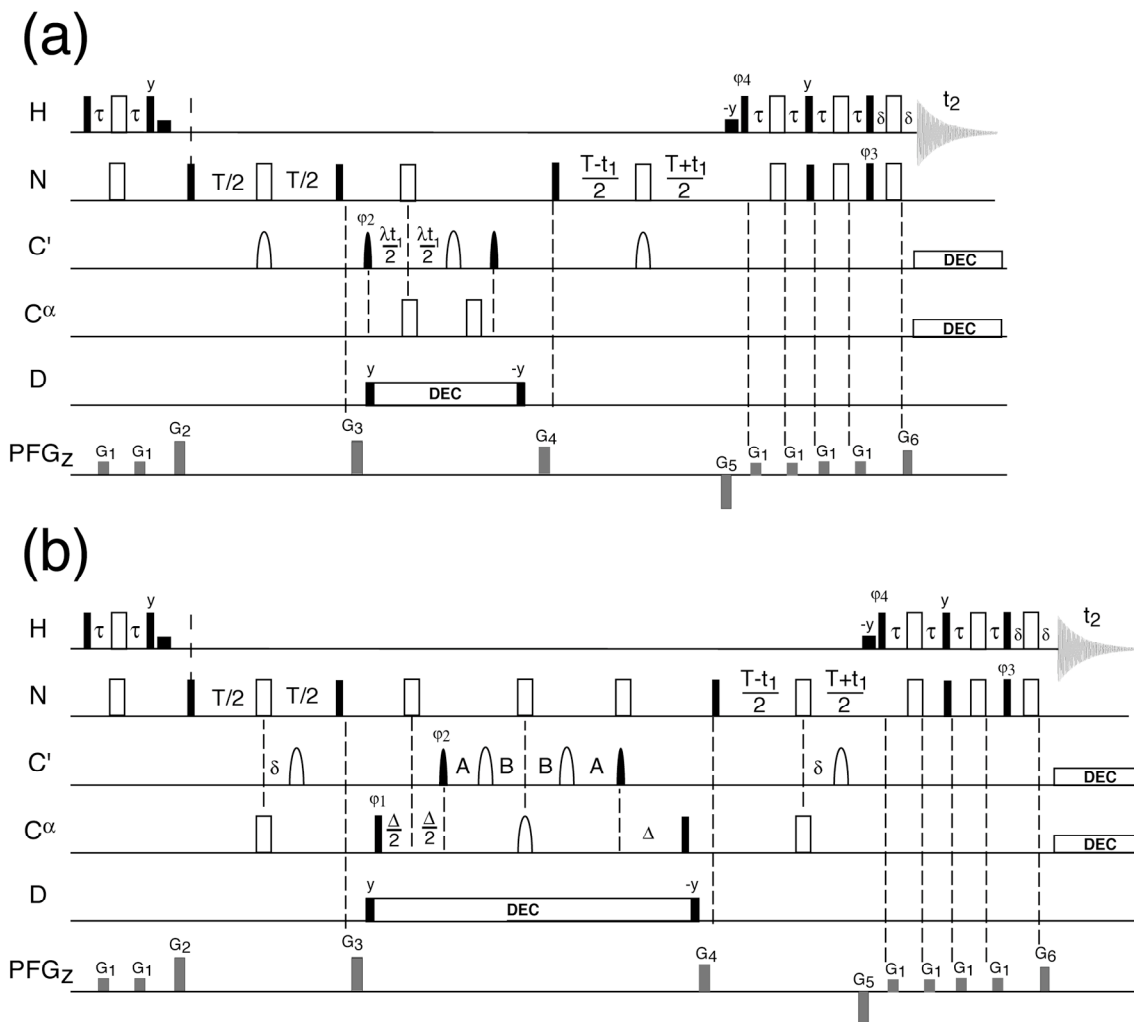


FIGURE 23. Séquences d'impulsions d'une expérience (3,2)-D (a) seq-HNCO et (b) *intra*-HNCO [40]. Les délais de transfert sont ajustés à: (a)  $\tau = 1/4J_{NH}$ ,  $T = 1/2J_{NC'}$ , (b)  $\tau = 1/4J_{NH}$ ,  $T = 1/2J_{NC'}$ ,  $\Delta = 1/2J_{C^{\alpha}C^{\alpha}}$ ,  $A = (T_C - 2\Delta + t_1)/4$ ,  $B = (T_C - 2\Delta - t_1)/4$ , avec  $T_C = 1/J_{C^{\alpha}C^{\alpha}}$ . La durée relative des gradients  $G_5$  et  $G_6$  est donnée par le rapport  $G_5/G_6 = \gamma_H/\gamma_N$ .

### 3.2 Attribution $^1\text{H}$ et $^{13}\text{C}$ des chaînes latérales

Malgré certains progrès récents visant à déterminer la structure d'une protéine à partir de contraintes RMN sur les atomes de la chaîne principale uniquement [41], une étude structurale d'une protéine par RMN est généralement basée sur l'attribution d'au moins une partie des  $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$  des chaînes latérales. Il est donc intéressant de développer des schémas d'acquisition rapide permettant d'étendre l'attribution de la chaîne principale aux atomes des chaînes latérales. L'attribution des chaînes latérales peut être réalisé en utilisant des expériences corrélant les  $^1\text{H}$  et

$^{13}\text{C}$  des chaînes aliphatiques ou aromatiques aux  $^1\text{H}$  et  $^{15}\text{N}$  du squelette peptidique. Les expériences les plus repondues et les plus sensibles pour cette étape d'attribution sont du type HCCONH-COSY [42] ou HCCONH-TOCSY [43]. Dans la première expérience (HCCONH-COSY), seulement les  $\text{C}^\alpha$  ( $\text{H}^\alpha$ ) et  $\text{C}^\beta$  ( $\text{H}^\beta$ ) sont corrélés avec le groupement amide du résidu suivant, tandis que dans la deuxième expérience (HCCONH-TOCSY) toute la chaîne peut être corrélée. En général, des spectres 3D ( $\text{H}^\text{N}$ , N, C), 3D ( $\text{H}^\text{N}$ , N,  $\text{H}^\text{C}$ ), ou 4D ( $\text{H}^\text{N}$ , N, C,  $\text{H}^\text{C}$ ) sont enregistrés ce qui nécessite des temps expérimentaux de quelques jours (voir figure 3).

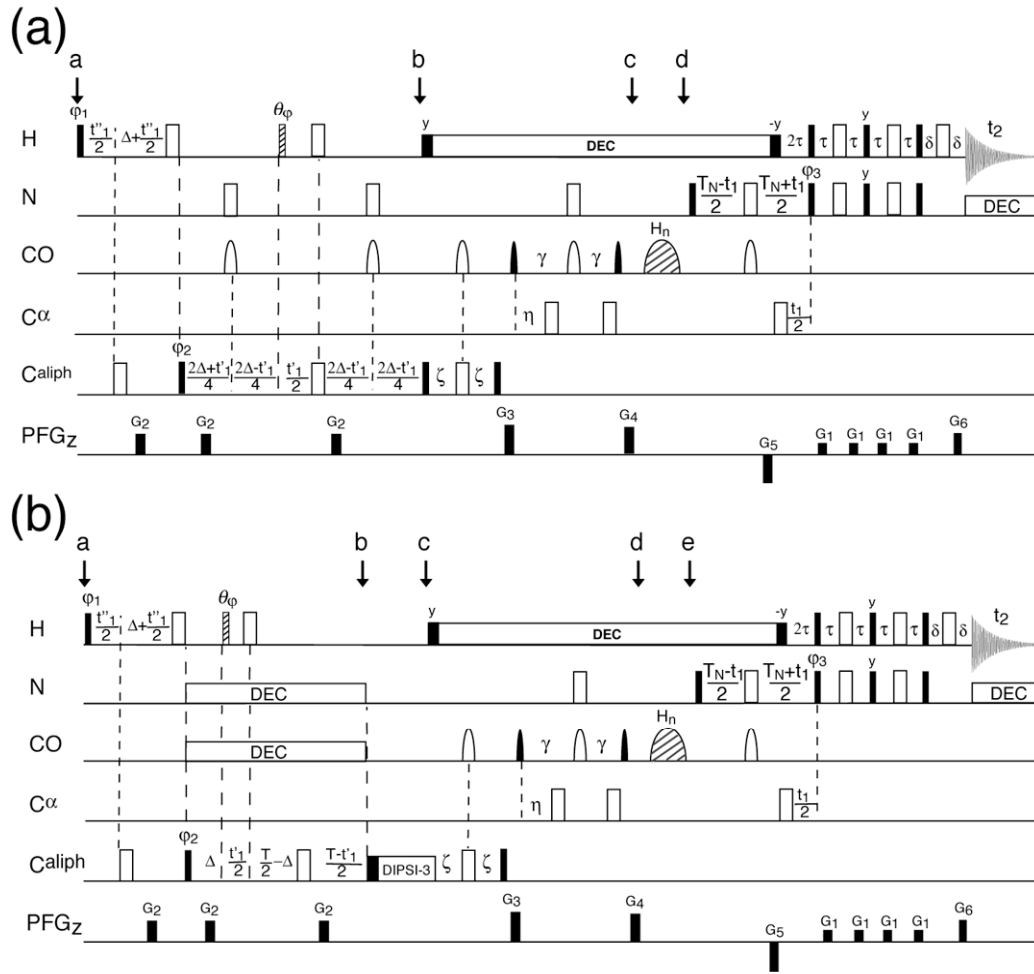


FIGURE 24. Séquences d'impulsions pour les expériences (a) ((4,2)+1)-D DEPT-HC(CO)NH-COSY et (b) ((4,2)+1)-D DEPT-CT-HC(CO)NH-TOCSY. Les délais de transfert sont ajustés à  $\Delta = 1/2J_{\text{CH}}$ ,  $\tau = 1/4J_{\text{NH}}$ ,  $\eta = \zeta = 1/4J_{\text{C}^\alpha\text{C}^\beta}$ ,  $2\gamma = T_N = 1/4J_{\text{NC}}$ , et  $T = 1/J_{\text{CC}}$ . La durée relative des gradients  $G_5$  et  $G_6$  est donnée par le rapport  $G_5/G_6 = \gamma_{\text{H}}/\gamma_{\text{N}}$ . Plus de détails expérimentaux peuvent être trouvés dans la référence [44].

Afin d'accélérer l'acquisition de ces spectres nous avons développé de nouvelles séquences d'impulsions (figure 24) basées sur une combinaison des techniques de la *RMN projetée* et la *RMN filtrée* [44]. Les fréquences N, C, et  $\text{H}^\text{C}$  sont éditées le long d'un unique axe de projection comme expliqué au sous-chapitre 2.2. Contrairement aux expériences de corrélation de type H-N-X unidirectionnelle (voir chapitre précédent), cette fois-ci plusieurs pics de corrélation sont détectés par résidu ce qui rend l'interprétation des spectres de projection plus difficile. Afin de simplifier

les spectres un filtre DEPT <sup>[45]</sup> est utilisé qui sépare les pics de corrélation provenant de différents groupements CH<sub>n</sub> en fonction de leur multiplicité *n*. Plusieurs expériences sont enregistrées en changeant l'angle de rotation  $\theta$  d'une impulsion <sup>1</sup>H (figure 24). L'amplitude des signaux provenant de différents groupements CH<sub>n</sub> est proportionnelle au terme  $\sin(\theta)\cos^{n-1}(\theta)$ . Des combinaisons linéaires de spectres, obtenus pour différentes valeurs  $\theta$ , séparent les groupements CH<sub>n</sub>. Le filtre DEPT a été choisi parmi les différentes techniques existantes, car il permet de réaliser en même temps un transfert de cohérence, une édition de fréquence, et un filtrage spectral avec une bonne tolérance par rapport aux couplages <sup>1</sup>J<sub>CH</sub> qui varient dans les chaînes aliphatiques entre environ 120 et 150Hz. En conséquence, la sensibilité des expériences n'est que peu affectée par le filtre. Des spectres ((3,2)+1)-D ou ((4,2)+1)-D peuvent ainsi être enregistrés en quelques heures pourvu que la sensibilité intrinsèque (échantillon et spectromètre) soit suffisante. Dans le cas de protéines de taille élevée, un filtre additionnel CO-H<sub>4</sub> permet de disperser les pics en fonction des plages de fréquences <sup>13</sup>CO (voir sous-chapitre précédent).

Les deux expériences de la figure 24 permettent d'attribuer sans ambiguïté les <sup>1</sup>H et <sup>13</sup>C de toutes les chaînes aliphatiques à l'exception des résidus suivants les prolines et les méthyles en position  $\epsilon$  des méthionines. Dans la suite de ce paragraphe nous allons discuter deux caractéristiques particulièrement intéressantes et utiles de ces expériences.

*Identification du type d'acide aminé.* Les spectres de corrélation (H<sup>N</sup>, N, C) obtenus avec les expériences de la figure 24 donnent des informations sur le type d'acide aminé du résidu précédant le groupement amide H<sup>N</sup>-N. Par exemple, un spectre DEPT-(H)C(CO)NH-COSY permet de distinguer les résidus avec, en position  $\beta$ , un groupement CH<sub>3</sub> (Ala), CH<sub>2</sub> (Val, Ile, Thr) ou CH (tous les autres). Combinée avec l'information contenue dans les valeurs des fréquences C <sup>$\alpha$</sup>  et C <sup>$\beta$</sup>  <sup>[42a]</sup>, ceci permet d'identifier sans ambiguïté les résidus de type Ala, Gly, Thr, Ser, et la paire Val-Ile. Ceci fournit des points d'ancrage précieux pour l'attribution séquentielle. Davantage d'informations sur le type d'acide aminé d'un résidu est obtenue dans une expérience DEPT-CT-HC(CO)NH-TOCSY, notamment sur les chaînes longues. Il est donc intéressant d'enregistrer et d'analyser ces spectres avant même d'effectuer l'attribution de la chaîne principale.

*Attribution <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C rapide des groupements méthyles.* L'expérience ((4,2)+1)-D DEPT-CT-HC(CO)NH-TOCSY est particulièrement adaptée à l'attribution des groupements méthyles pour différentes raisons. Premièrement, à cause d'une relaxation transversale peu efficace des <sup>13</sup>C dans les méthyles, la perte de signal pendant le délai T de 28ms est limitée, permettant d'obtenir des spectres d'un bon rapport S/N dans un temps expérimental court. Deuxièmement, un maximum de deux pics de corrélation est attendu par résidu, ce qui facilite l'analyse des spectres de projection 2D. Troisièmement, les méthodes de deutération avec reprotonation spécifique des groupements méthyles <sup>[39]</sup>, permettent d'appliquer cette expérience <sup>[39]</sup> aux protéines de taille élevée. À cause de leur localisation préférentielle dans les poches hydrophobes de la protéine, les groupements méthyles sont des sondes extrêmement valables pour étudier la structure ou la dynamique de la molécule. Différents spectres de projection de l'expérience DEPT-CT-HC(CO)NH-TOCSY

enregistrés sur un échantillon de la protéine MerAa (67 résidus) à 600MHz sont montrés dans la figure 25.

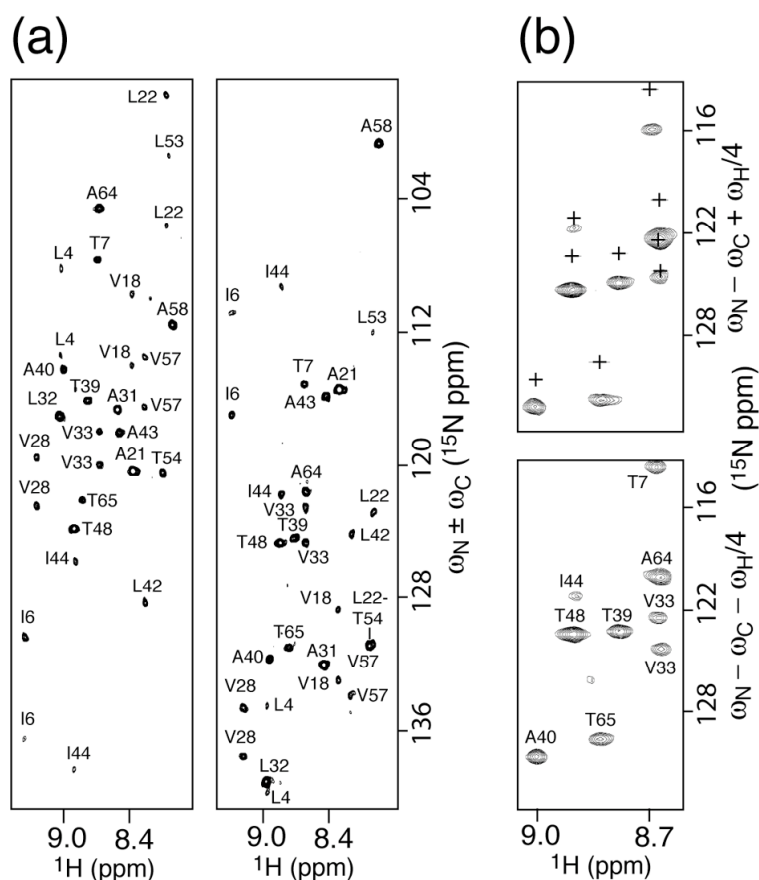


FIGURE 25. Différents plans de projection extraits d'un spectre ((4,2)+1)-D DEPT-CT-HC(CO)NH-TOCSY enregistré à 600MHz sur un échantillon de MerAa. Seulement une partie du spectre est montrée. Tous les pics sont attribués par le type et le numéro du résidu. Pour l'analyse des spectres (a) l'information des pics centraux est obtenue par un spectre de corrélation 2D  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ . Pour l'analyse des spectres (b) cette information est obtenue par un des spectres de projection en (a). Une croix dans le spectre du haut (b) indique la position d'un pic dans le spectre du bas.

Pour la dimension du filtre DEPT, 3 expériences ont été enregistrées avec des angles  $\theta$  ajustés à (I)  $\theta = 30^\circ$ , (II)  $\theta = 150^\circ$  et (III)  $\theta = 90^\circ$ . Ce choix particulier des angles  $\theta$  est optimal pour la sensibilité du spectre  $\text{CH}_3$  obtenu par la combinaison linéaire (I)+(II)-(III). Les spectres de projection de la figure 25 ont été obtenus pour différentes combinaisons de facteurs d'échelle (angles de projection): (a)  $\lambda_C = 1, \lambda_H = 0$  (donnant 2 spectres de projection) et (b)  $\lambda_C = 1, \lambda_H = 0.25$  (donnant 4 spectres de projection) dans un temps expérimental de 2h et 8h, respectivement. Ainsi tous les spectres de projection ont un rapport S/N comparable. L'analyse conjointe de ces 6 spectres de projections a permis l'attribution complète et non ambiguë de tous les groupements méthyles de la protéine qui ne sont pas suivis par une proline dans la séquence peptidique.

## 4 Détermination rapide du repliement des protéines

Une fois l'étape d'attribution franchie, il reste à mesurer un nombre de contraintes structurales suffisant pour déterminer sans ambiguïté le repliement de la chaîne peptidique dans l'espace. Ces contraintes structurales sont obtenues à travers la quantification de certains paramètres spectraux qui peuvent être traduits en distances internucléaires (NOE), angles de torsion (couplages  $J$ , fréquences  $^{13}\text{C}$ , et certaines vitesses de relaxation), ou orientation d'un vecteur nucléaire par rapport à un repère fixe de la molécule (couplages dipolaires résiduels). En règle générale, plus les contraintes structurales sont nombreuses, fiables, et bien réparties sur la molécule, plus la définition de la structure va être précise.

### 4.1 Contraintes structurales pour la détermination rapide du repliement global

Dans ce chapitre, nous allons nous intéresser plus particulièrement à une stratégie mise au point pour la détermination rapide du repliement global de la protéine. On entend par repliement global que la chaîne principale se trouve correctement située dans l'espace, mais pas nécessairement l'ensemble des chaînes latérales. La stratégie adoptée est illustrée dans la figure 26.

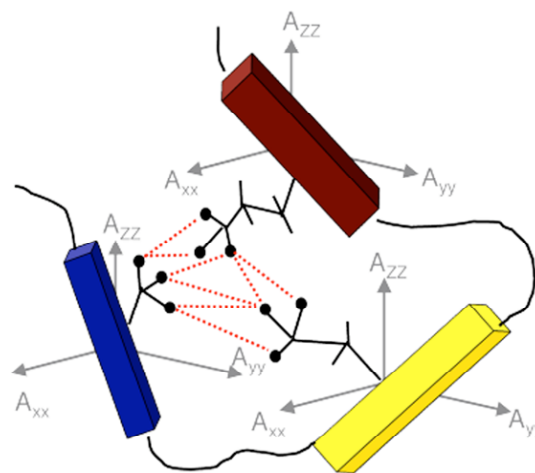


FIGURE 26. Schéma illustrant la stratégie adoptée pour le calcul de structure d'une protéine basée sur un nombre restreint de contraintes RMN non ambiguës. Les différents blocs colorés représentent les éléments de structure secondaire, et les  $A_{xx}$ ,  $A_{yy}$  et  $A_{zz}$  caractérisent les axes principaux du tenseur d'alignement de la molécule.

On peut distinguer 3 types d'informations structurales utilisées pour le calcul du repliement global par RMN:

*Identification des éléments de structures secondaires (hélices  $\alpha$ , brins  $\beta$ ):* cette information est disponible directement après l'attribution séquentielle de la chaîne principale. Les fréquences de résonance  $^{13}\text{C}$  d'un résidu sont caractéristiques des différentes structures secondaires <sup>[46]</sup> et peuvent être utilisées pour identifier et délimiter les éléments de structure secondaire le long de la chaîne peptidique. Dans un calcul de structure, cette information est utilisée sous forme de contraintes d'angles dièdres  $\phi$  et  $\psi$ .

*Appariement des brins  $\beta$  en feuillets:* différents paramètres RMN permettent d'identifier les liaisons hydrogène entre deux brins  $\beta$  adjacents d'un feuillet parallèle ou antiparallèle. La mesure de couplages scalaires  ${}^2J_{\text{NC}}$  à travers la liaison hydrogène est la façon la plus directe pour établir la présence d'une telle liaison <sup>[7c]</sup>. Malheureusement, les constantes de couplage sont faibles (<1Hz) et leur mesure peu sensible, nécessitant plusieurs jours de temps d'acquisition. Une méthode alternative pour obtenir cette information est la détection de NOE  $\text{H}^{\text{N}}\text{-H}^{\text{N}}$  et  $\text{H}^{\text{N}}\text{-H}^{\alpha}$  entre brins à partir d'un spectre NOESY 2D ou 3D. Ces données peuvent être complétées par la mesure de vitesses d'échange des  ${}^1\text{H}$  amide avec le solvant, indicative de l'implication du  ${}^1\text{H}$  dans une liaison hydrogène.

*Arrangement relatif des éléments de structure secondaire:* finalement, pour placer les différents éléments de structures dans l'espace, deux types de contraintes complémentaires sont utilisés. Les NOE  ${}^1\text{H}\text{-}{}^1\text{H}$  entre groupements méthyles fournissent des informations de distance à longue portée. Les couplages dipolaires résiduels (RDC), mesurés pour différents vecteurs internucléaires d'un même plan peptidique, permettent d'orienter les éléments de structure secondaire l'un par rapport à l'autre et d'affiner leur conformation locale, ainsi que celle de certaines boucles peu flexibles.

Une fois le repliement global connu, la structure peut être affinée en attribuant des NOE supplémentaires en se basant sur les coordonnées moléculaires et en utilisant un algorithme itératif pour le calcul de structure et l'attribution des spectres NOESY <sup>[47]</sup>. Dans la suite de ce chapitre, deux nouvelles expériences sont présentées pour l'acquisition rapide de spectres RMN permettant (i) la mesure de distances entre méthyles dans les poches hydrophobes de la protéine et (ii) la mesure de deux couplages dipolaires résiduels par plan peptidique.

#### 4.2 *Expérience pour la mesure rapide de distances entre méthyles*

Les groupements méthyles d'une protéine sont souvent bien dispersés le long de la chaîne peptidique, et généralement situés dans les poches hydrophobes de la molécule. C'est pourquoi différents méthyles éloignés dans la séquence primaire peuvent se retrouver proches dans l'espace ce qui rend la mesure de NOE méthyle-méthyle une source importante d'information structurale à longue portée. En plus, même pour les protéines de taille élevée, les spectres de corrélation  ${}^1\text{H}\text{-}{}^{13}\text{C}$  des méthyles restent relativement bien résolus avec un bon rapport S/N, ce qui s'explique par leurs propriétés favorables de relaxation transversale et la présence des 3  ${}^1\text{H}$  équivalents. Nous avons déjà présenté dans le chapitre précédant une expérience permettant d'attribuer le spectre  ${}^1\text{H}\text{-}{}^{13}\text{C}$  des méthyles à partir de spectres de projection 2D enregistrés en seulement quelques heures.

Des expériences de type 3D NOESY-HSQC ou 3D HSQC-NOESY-HSQC <sup>[48]</sup> sont généralement utilisées pour détecter des NOE entre méthyles. Afin d'augmenter la résolution spectrale dans les dimensions  ${}^{13}\text{C}$ , l'édition des fréquences est réalisée par la technique d'édition à temps constant (CT) <sup>[49]</sup>. Pour le cas des petites protéines, une expérience 3D NOESY permet généralement l'attribution sans ambiguïté d'un grand nombre de pics NOE.

La question du temps expérimental minimal se pose différemment pour les expériences NOESY, basées sur un transfert entre spins à travers l'espace, que pour les expériences décrites dans le chapitre précédent, faisant intervenir uniquement des transferts par couplage scalaire ( $J$ ). Pour ces dernières, le nombre attendu de pics de corrélation est fixe, et le nombre d'accumulations du signal (voir eq. [2]) nécessaire à faire sortir l'intensité de ces pics du bruit détermine le temps expérimental minimal. Dans le cas d'une expérience NOESY, le nombre de pics détectés, et en conséquence l'information obtenue sur la molécule, croît avec le temps expérimental. Plus le rapport S/N dans le spectre est élevé, plus des pics NOE peuvent être observés entre protons éloignés dans l'espace. Dans le cas des expériences 3D NOESY méthyle-méthyle, un temps expérimental minimal de l'ordre de 24 heures est requis sur un spectromètre haut champ afin d'échantillonner un nombre suffisant de points dans les 2 dimensions indirectes. Pour des petites protéines protonées, ceci est souvent largement supérieur au temps nécessaire à détecter suffisamment de pics NOE à longue portée pour définir le repliement de la protéine. Dans le contexte d'une stratégie d'acquisition rapide des données RMN pour la détermination structurale de protéines, il est donc intéressant de disposer d'une expérience permettant de collecter des spectres NOESY méthyle-méthyle dans un temps d'acquisition réduit à quelques heures. Nous avons mis au point une telle expérience <sup>[50]</sup>, montrée dans la figure 27.

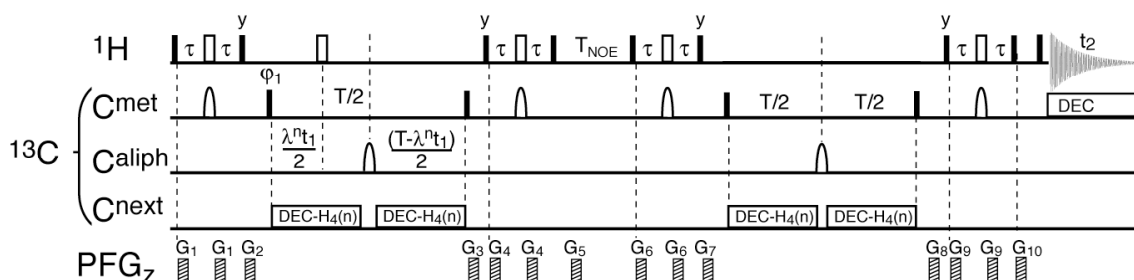
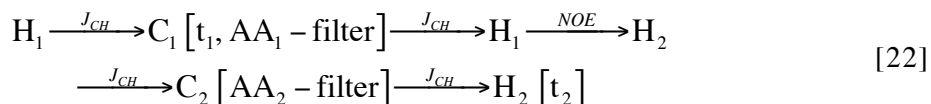


FIGURE 27. Séquence d'impulsions d'une expérience NOESY méthyle-méthyle avec édition du type d'acide aminé. La porteuse <sup>13</sup>C est placée au centre du spectre C<sup>met</sup> (19ppm). Les impulsions rf sur les autres canaux <sup>13</sup>C sont réalisées par une rampe de phase. Les différents délais sont ajustés à  $\tau = 1/4J_{CH}$  et  $T = 1/J_{CC}$ . Plus de détails expérimentaux peuvent être trouvés dans la référence [50].

La séquence est du type CT-<sup>13</sup>C-HSQC-NOESY-CT-<sup>13</sup>C-HSQC avec le chemin de transfert de polarisation entre deux méthyles donné par :



Les deux groupements méthyles, à l'origine de l'interaction NOE, sont identifiés par la fréquence <sup>13</sup>C et le type d'acide aminé du résidu pour le *méthyle-1* et la fréquence <sup>1</sup>H et le type d'acide aminé du résidu pour le *méthyle-2* dans un spectre à  $(2_{cs}+2_{aa})$  dimensions. Le concept innovateur de cette expérience est un filtrage des signaux par type d'acide aminé (*AA-filter*). Cette technique permet de limiter le nombre de spins édités en fréquence à 2 ( $2_{cs}$ ) en ajoutant 2 dimensions d'édition spectrale ( $2_{aa}$ ) pour disperser les pics de corrélation en fonction du type d'acide aminé des deux méthyles. Ceci fournit la résolution spectrale requise pour l'attribution des pics de corrélation à



une paire de groupements méthyle de la protéine, en gardant un temps d'acquisition comparable à une expérience FT-RMN-2D.

#### 4.2.1 Filtre d'édition spectrale par type d'acide aminé

L'idée de base du filtre est illustrée dans la figure 28. Les groupements méthyle sont situés au bout des chaînes latérales des acides aminés. Ainsi les  $^{13}\text{C}$  des méthyles ( $\text{C}^{\text{met}}$ ) sont liés d'une manière covalente à un seul autre atome de carbone ( $\text{C}^{\text{next}}$ ). L'environnement chimique des carbones  $\text{C}^{\text{next}}$  est différent d'un acide aminé à l'autre, résultant en des plages de déplacements chimiques distinctes (fig. 28a).

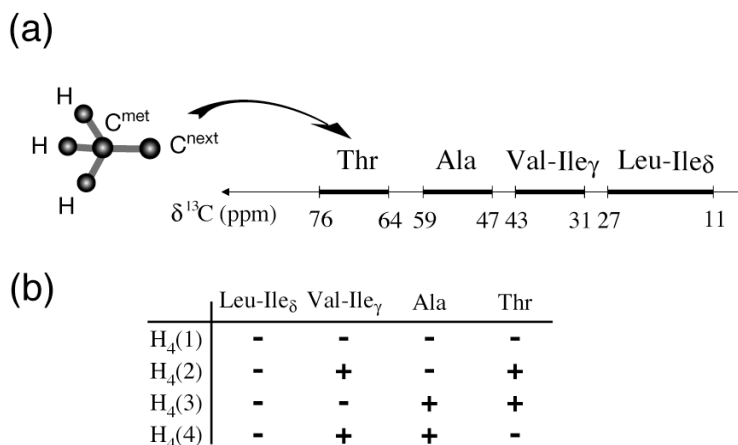


FIGURE 28. Schéma de filtrage spectral par type d'acide aminé. (a) bandes de fréquences pour les  $^{13}\text{C}$  attachés aux différents groupements méthyle d'une protéine. (b) schéma de codage Hadamard  $H_4$  utilisé pour le filtre.

Cette propriété est exploitée par le filtre pour séparer les méthyles avec des  $\text{C}^{\text{next}}$  résonnants dans une des 4 bandes spectrales définies dans la figure 28a. Un filtre de type Hadamard  $H_4$  est utilisé pour effectuer un codage binaire (+1 ou -1) de l'appartenance du méthyle à l'une de ces bandes  $\text{C}^{\text{next}}$ . Expérimentalement, le codage en (-1) est réalisé par l'évolution d'une cohérence  $\text{C}_x^{\text{met}}$  pendant un délai  $T=1/J_{CC}$  sous l'effet du couplage  $J_{CC}$ .

$$\text{C}_x^{\text{met}} \xrightarrow{J_{CC}} -\text{C}_x^{\text{met}} \quad [23]$$

En revanche, un codage en (+1) est obtenu en supprimant l'effet du couplage  $J_{CC}$  pendant le délai T par un découplage sélectif d'une bande de fréquences  $\text{C}^{\text{next}}$ .

$$\text{C}_x^{\text{met}} \xrightarrow{\text{dec}} +\text{C}_x^{\text{met}} \quad [24]$$

L'expérience est répétée 4 fois en découplant différentes bandes  $\text{C}^{\text{next}}$  comme montré dans la figure 28b. En conséquence, le signe du signal RMN correspondant aux différentes bandes de fréquence est changé d'après une matrice Hadamard d'ordre 4.

Pour le découplage sélectif, un train d'impulsion WURST-2 <sup>[51]</sup> d'une durée de 5ms est appliqué pendant le délai T. Pour une bonne performance du filtre, il est indispensable de supprimer ou de compenser les effets d'un tel découplage homonucléaire sur le spectre  $^{13}\text{C}$  des

méthyles. Une évaluation théorique et expérimentale des déplacements Bloch-Siegert et des bandes latérales de modulation, induites par le découplage  $C^{\text{next}}$ , peut être trouvée dans l'article [52]. L'application d'un découplage additionnel hors résonance, symétrique par rapport au spectre  $C^{\text{met}}$ , et l'ajustement d'un certain nombre de paramètres d'acquisition, permettent de supprimer efficacement ces artefacts de découplage. Ceci est illustré dans la figure 29 qui montre un spectre de corrélation  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  CT-HSQC des groupements méthyles de la protéine MerAa enregistré avec un filtre d'édition spectrale par type d'acide aminé.

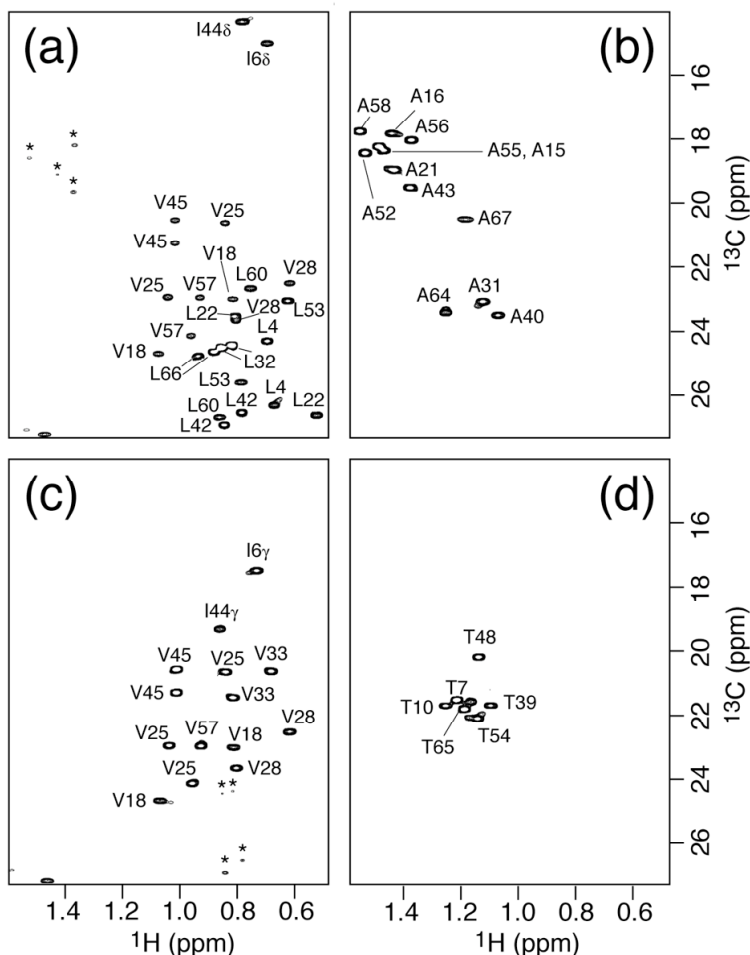


FIGURE 29. Spectre de corrélation  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  ( $2_{cs}+1_{aa}$ )-D de groupements méthyles dans la protéine MerAa. Les différents spectres 2D correspondent aux bandes : (a) Met, Leu et  $Ile_{\delta}$ , (b) Ala, (c) Val et  $Ile_{\gamma}$  et (d) Thr. Tous les pics de corrélation sont annotés par le numéro et le type du résidu. Une étoile indique un pic artefactuel dû à une imperfection du filtre.

Les 4 spectres 2D extraits le long de la dimension du filtre correspondent aux méthyles des résidus Met, Leu et  $Ile_{\delta}$  (fig. 29a), Ala (fig. 29b), Val et  $Ile_{\gamma}$  (fig. 29c), Thr (fig. 29d). Alors que la séparation des bandes Ala et Thr est parfaite, certains pics Val sont aussi détectés dans le spectre (a) correspondant aux résidus Met, Leu et  $Ile_{\delta}$ . Ceci s'explique par le fait que plus de 95% des Thr et Ala, mais seulement  $\approx 70\%$  des Val ont leur fréquence  $C^{\text{next}}$  à l'intérieur de la bande spectrale définie dans la figure 28a. Le gain de résolution obtenu par ce filtre est important, ce qui rend intéressant son implémentation dans de nombreuses expériences RMN utilisant les groupements

méthyles comme sondes locales pour explorer la structure de la molécule <sup>[53]</sup>, la dynamique des chaînes latérales <sup>[54]</sup>, ou les interfaces intermoléculaires <sup>[55]</sup>.

#### 4.2.2 Application aux protéines de petite taille

Avec la séquence de la figure 27, des spectres  $(2_{cs}+2_{aa})$ -D NOESY méthyle-méthyle peuvent être enregistrés en quelques heures si la sensibilité, obtenue pour un échantillon et un spectromètre donné, le permet. Deux filtres  $H_4$  d'édition spectrale sont appliqués dans cette expérience, l'un avant et l'autre après le temps de mélange NOE. Ainsi, les pics de corrélation sont dispersés dans 4x4 spectres 2D différents. Ceci permet de s'affranchir de certains problèmes qui rendent l'interprétation et l'attribution d'un spectre 2D NOESY standard difficiles, voire impossibles. Premièrement, la résolution spectrale accrue obtenue par les filtres permet de séparer certains pics de corrélation qui seraient si-non superposés. Deuxièmement, l'identification du type d'acide aminé des deux méthyles réduit le nombre d'attributions possibles. Finalement, l'intensité des pics diagonaux d'un spectre NOESY est souvent d'un ordre de grandeur plus élevé que celle des pics croisés NOE, ce qui rend difficile l'observation de pics de faible intensité en présence de pics diagonaux. Dans le cas d'une séparation parfaite par le filtre, des pics diagonaux ne sont plus que détectés dans 4 des 16 spectres 2D, alors que les 12 autres spectres 2D ne contiennent que des pics croisés NOE, facilitant ainsi leur analyse. Des exemples de plans 2D ( $C_i, H_j$ ), extraits d'une expérience  $(2_{cs}+2_{aa})$ -D NOESY de la protéine MerAa, sont montrés dans la figure 30. Le spectre a été enregistré sur un échantillon de 1.5mM à 800MHz (25°C) en 4 heures.

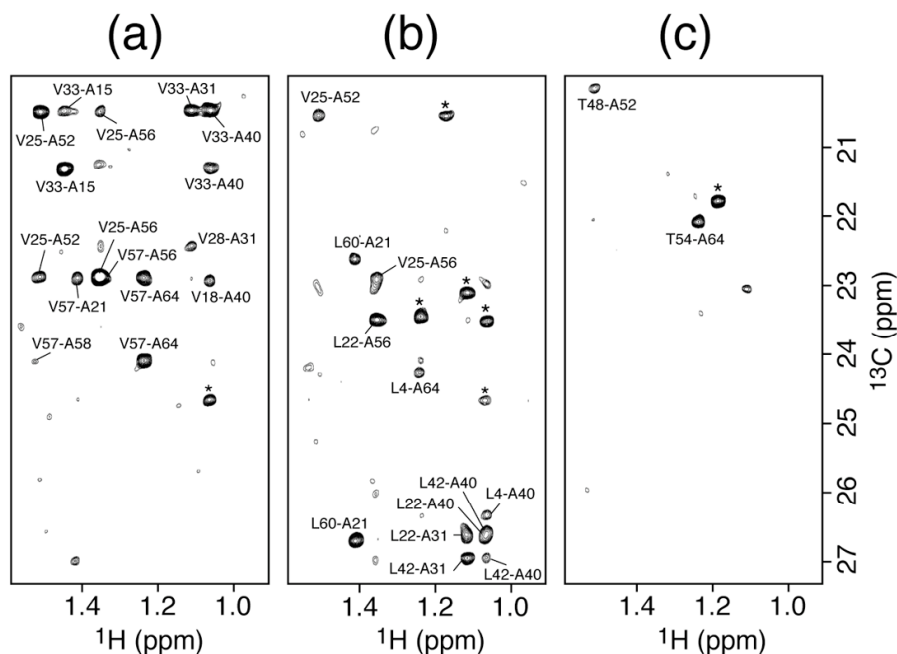


FIGURE 30. (a-c) différents plans 2D ( $C_i, H_j$ ) extraits d'un spectre  $(2_{cs}+2_{aa})$ -D NOESY de la protéine MerAa enregistré à 800MHz. Le temps de mélange NOE a été ajusté à  $T_{NOE}=200ms$ . Les pics NOE sont annotés par le numéro et type des deux résidus impliqués dans l'interaction. Une étoile indique un pic diagonal résiduel.

Les pics de corrélation observés correspondent à des NOE entre un méthyle d'un résidu *Ala* avec un méthyle d'un résidu (a) *Val-Ile<sub>γ</sub>*, (b) *Leu-Ile<sub>δ</sub>*, ou (c) *Thr*. Un petit nombre de pics diagonaux est détecté dans ces plans avec une intensité comparable à celle des pics croisés NOE. La grande résolution spectrale de ces plans 2D fait que la plupart des pics NOE, observés pour cette petite protéine, sont bien résolus. L'attribution des pics NOE à une paire de groupements méthyles de la protéine est simplifiée par la redondance de l'information dans le spectre. Pour chaque pic détecté aux fréquences ( $C_1, AA_1, H_2, AA_2$ ) un deuxième pic est attendu aux fréquences ( $C_2, AA_2, H_1, AA_1$ ) dans le spectre ( $2_{cs}+2_{aa}$ )-D NOESY, permettant ainsi de résoudre des ambiguïtés d'attribution. Un protocole simple, implémenté dans un programme en langage C, est utilisé pour effectuer cette tâche d'attribution à partir d'une liste de fréquences obtenue par un *peak picking* du spectre ( $2_{cs}+2_{aa}$ )-D.

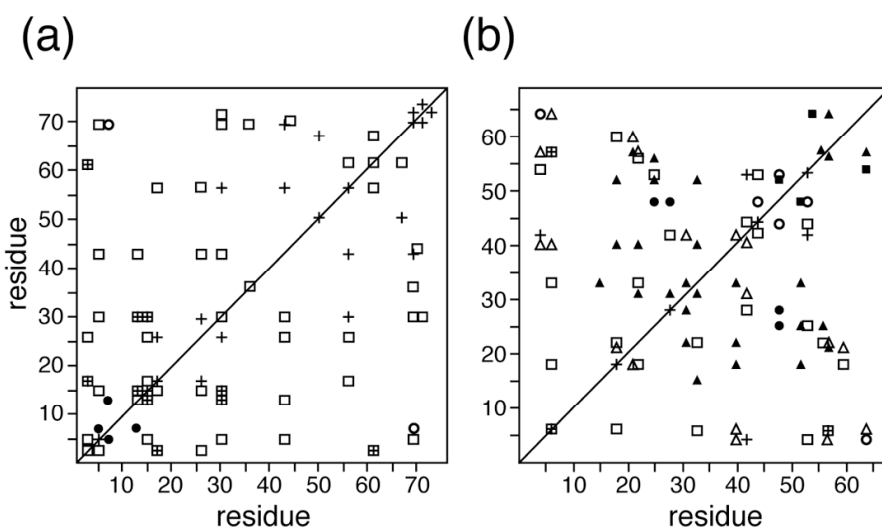


FIGURE 31. Représentations schématiques des NOE méthyle-méthyle observés dans les deux protéines (a) ubiquitin et (b) MerAa dans une expérience ( $2_{cs}+2_{aa}$ )-D NOESY utilisant la séquence d'impulsions de la figure 27, enregistrée en 2h et 4h, respectivement. Les différents symboles indiquent que les pics NOE ont été détectés dans différentes paires de plans aux coordonnées ( $AA_1, AA_2$ ). Une croix représente un plan diagonal.

Le résultat obtenu pour les deux petites protéines ubiquitin (76 résidus) et MerAa (67 résidus) est montré dans les figures 31a et 31b, respectivement, en forme d'un graphe de connectivités NOE entre résidus  $i$  et  $j$  de la chaîne peptidique. 52 (ubiquitin) et 58 (MerAa) contraintes de distances à moyenne et à longue portée ( $j > i + 2$ ) ont pu être observées et attribuées sans ambiguïté à partir des spectres ( $2_{cs}+2_{aa}$ )-D NOESY méthyle-méthyle. Pour les deux protéines, la plupart des NOE ont été observés dans des plans "sans" pics diagonaux. Malgré une composition différente des deux protéines en acides aminés, les contraintes de distances extraites de l'expérience ( $2_{cs}+2_{aa}$ )-D NOESY sont suffisantes pour déterminer le repliement global de la protéine. Le nombre de contraintes de distance à longue portée, obtenu avec cette nouvelle expérience est comparable aux résultats d'une étude basée sur l'analyse d'un spectre 3D HSQC-NOESY-HSQC standard enregistré dans un temps expérimental environ 10 fois plus long <sup>[56]</sup>.

### 4.3 Expérience pour la mesure rapide de couplages dipolaires résiduels

#### 4.3.1 Les couplages dipolaires résiduels

Les couplages dipolaires résiduels (RDC) donnent accès à un type différent de contraintes structurales. Chaque couplage mesuré peut être utilisé comme contrainte orientationnelle (et, dans le cas d'une distance variable, aussi translationnelle) du vecteur reliant les deux spins en interaction par rapport à un référentiel fixe de la molécule (tenseur d'alignement). En solution, les couplages dipolaires entre deux spins sont moyennés à zéro par la réorientation rapide de la molécule ( $\tau_c =$  quelques *ns*). Pour pouvoir mesurer ces effets, la molécule doit soit posséder une susceptibilité magnétique anisotrope qui provoque un faible alignement de la molécule dans le champ magnétique statique, soit être dissoute dans un solvant de type cristal-liquide qui forme un environnement anisotrope pour la molécule [5]. Un grand nombre de milieux anisotropes ont été décrits dans la littérature permettant de réaliser un faible alignement des protéines en solution. Quelques exemples sont les bicelles lipidiques, les bactériophages, les membranes pourpre, certains mélanges d'alcools, ou encore les gels polyacrylamides. Une revue des différents milieux orientants actuellement utilisés en RMN biomoléculaire peut être trouvée dans la référence [57]. Par ces techniques on peut atteindre des paramètres d'ordre (degré d'alignement) de typiquement  $S=10^{-4}$  à  $S=10^{-3}$ . Des paramètres d'ordre plus élevés ne sont pas désirables car ils auraient comme conséquence une dégradation importante de la résolution des spectres RMN, notamment du  $^1\text{H}$ , dû à l'élargissement des raies de résonance par une multitude de couplages dipolaires résiduels. Plus de détails sur les couplages dipolaires résiduels et leur utilisation en RMN biomoléculaire peuvent être trouvés dans un grand nombre de revues publiées ces dernières années (par exemple [58]).

#### 4.3.2 L'expérience ((3,2)+1)-D J-HNCO(H)

La mesure de plusieurs RDC entre spins nucléaires faisant partie d'un même fragment structural, par exemple un plan peptidique ou un élément de structure secondaire, hélices  $\alpha$  ou brins  $\beta$ , permet de restreindre l'orientation de ce fragment moléculaire par rapport au tenseur d'alignement. Nous avons mis au point une expérience pour la mesure rapide des deux couplages entre le proton amide et l'azote  $J_{NH}$  et entre le proton amide et le carbonyle  $J_{CH}$  pour chaque plan peptidique de la protéine. Grâce à une orientation différente dans le plan peptidique des vecteurs internucléaires  $\text{N-H}^{\text{N}}$  et  $\text{CO-H}^{\text{N}}$ , ces deux RDC contiennent des informations structurales complémentaires. La base de l'expérience est du type 3D *seq*-HNCO projeté sur des plans 2D, similaire à celle de la figure 23a. La haute sensibilité de cette expérience assure une bonne précision de mesure des deux couplages dipolaires résiduels. La séquence d'impulsions de l'expérience ((3,2)+1)-D J-HNCO(H) est montrée dans la figure 32.

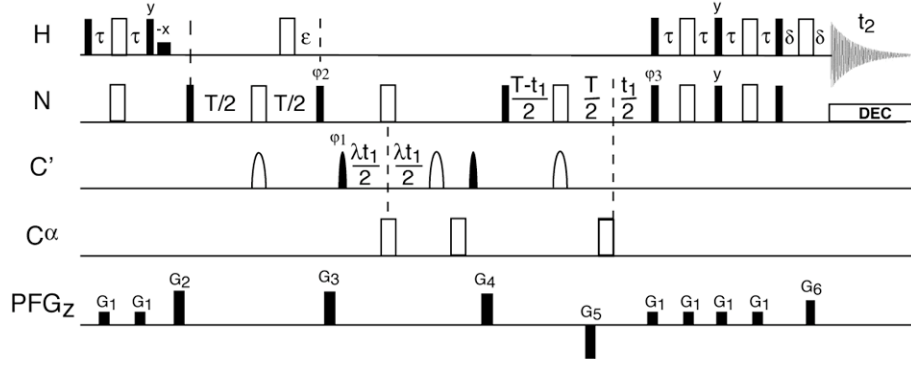


FIGURE 32. Séquence d'impulsions de l'expérience ((3,2)+1)-D J-HNCO(H). Les délais de transfert sont ajustés à  $\tau = 1/4J_{NH} \approx 2.7 \text{ ms}$  et  $T = 1/(2J_{NC'}) \approx 34 \text{ ms}$ . Pour le filtre DISPAP [59] l'expérience est répétée 3 fois avec les ajustements de paramètres suivants: (I)  $\varepsilon = 0$ ,  $\varphi_2 = y$ , (II)  $\varepsilon = 1/(4J_{NH})$ ,  $\varphi_2 = x$  et (III)  $\varepsilon = 1/(2J_{NH})$ ,  $\varphi_2 = y$ . Les sous spectres  $\alpha$  et  $\beta$  sont ensuite obtenus par les combinaisons linéaires :  $0.73 \times (I) \pm (II) - 0.27 \times (III)$ . Plus de détails expérimentaux peuvent être trouvés dans la référence [34].

Aucun découplage  $^1\text{H}$  n'est appliqué pendant les périodes d'édition de fréquences ( $t_1$ ) des spins  $^{15}\text{N}$  et  $^{13}\text{C}$ . En conséquence, des doublets de pics sont détectés dans les spectres de projection 2D aux fréquences:

$$\omega_1(\alpha) = \omega_N + \omega_{C'} \tan \alpha \pm \pi J_\alpha \quad [25]$$

$$J_\alpha = J_{NH}^{\text{eff}} + J_{C'H}^{\text{eff}} \tan \alpha = \left( {}^1J_{NH} + D_{NH} \right) + \left( {}^2J_{C'H} + D_{C'H} \right) \tan \alpha \quad [26]$$

avec  $J_{IS}$  et  $D_{IS}$  les contributions scalaires et dipolaires au couplage entre les deux spins I et S. Pour séparer les deux contributions scalaire et dipolaire, l'expérience doit être répétée pour deux échantillons de la protéine, le premier en solution isotrope ( $D_{IS} = 0$ ) et le deuxième en solution anisotrope ( $D_{IS} \neq 0$ ).

Afin de réduire le nombre de pics dans les différents spectres de projection, un filtre d'édition spectrale est appliqué permettant de séparer les deux pics de chaque doublet. Nous avons implémenté un filtre de type DIPSAP (*double-inphase-single antiphase*) [59] dans la séquence de la figure 32 qui permet une bonne séparation des deux pics (intensité du pic résiduel  $< 0.2\%$  du pic majeur) même en présence d'une variation des constantes de couplages jusqu'à  $\pm 40\%$  de la valeur moyenne. Le filtre DIPSAP est appliqué pendant le délai de transfert  $^{15}\text{N} \rightarrow ^{13}\text{C}$ , ce qui évite l'ajout de délais supplémentaires de relaxation transversale. L'expérience est répétée 3 fois en changeant le délai  $\varepsilon$  et la phase  $\varphi_2$  comme expliqué dans la légende de la figure 32. Les deux sous spectres de la dimension du filtre DIPSAP, appelés spectre- $\alpha$  et spectre- $\beta$ , sont ensuite obtenus par des combinaisons linéaires des trois jeux de données. Finalement pour un facteur d'échelle  $\lambda$ ,  $2 \times 2$  plans 2D sont obtenus correspondant aux angles de projection  $+\alpha$  et  $-\alpha$ , et aux états du spin proton amide  $\alpha$  et  $\beta$ . Un seul pic de corrélation est détecté par résidu (excepté pour les prolines) dans chacun des plans 2D, similaires aux expériences (3,2)-D H-N-X présentées au sous-chapitre 3.1. L'information des pics centraux, nécessaire à l'analyse des spectres, est de nouveau obtenue par un simple spectre de corrélation  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ .

Une petite partie des 4 plans 2D extraits d'un spectre ((3,2)+1)-D J-HNCO(H), enregistré sur la protéine MerAa en solution anisotrope (facteur d'échelle  $\lambda=2.0$ ), est montrée dans la figure 33. L'expérience a été enregistrée en 45min sur un spectromètre 600MHz à une température de 25°C.

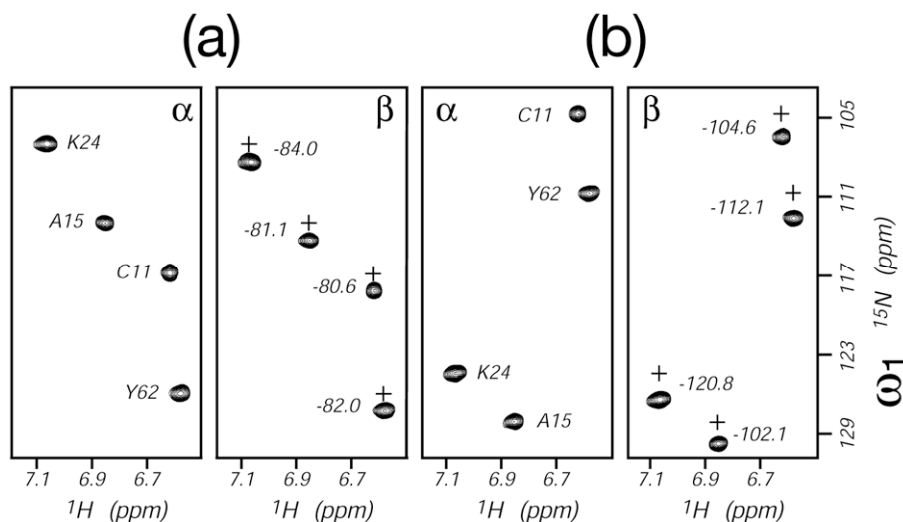


FIGURE 33. Partie des plans 2D extraits d'un spectre ((3,2)+1)-D J-HNCO(H) de la protéine MerAa en solution anisotrope (5% d'un mélange  $C_{12}E_6$ /hexanole dans un rapport molaire de 0.64 [60]). Les deux plans ( $\alpha$  et  $\beta$ ) pour un angle de projection de (a)  $63.4^\circ$  et (b)  $-63.4^\circ$ . Le symbole (+) dans les spectres de ( $\beta$ ) indique la position du pic correspondant dans le spectre ( $\alpha$ ).

Malgré la dispersion du signal en 4 pics, le rapport S/N obtenu dans un temps de moins d'une heure est excellent grâce à la sensibilité intrinsèque de l'expérience *seq*-HNCO. Après avoir attribué le spectre ((3,2)+1)-D J-HNCO(H) les positions  $\omega_1$  des 4 pics observés par résidu sont converties en 2 fréquences de résonance  $\omega_N$  et  $\omega_C$ , et 2 constantes de couplages  $J_{NH}^{eff}$  et  $J_{CH}^{eff}$  en utilisant les équations [25] et [26]. Notons d'abord que cette expérience permet d'attribuer les fréquences CO, permettant ainsi de compléter l'attribution de la chaîne principale obtenue par la série d'expériences H-N-X unidirectionnelles de la figure 19. Dans l'exemple des spectres de la figure 33, enregistrés pour un facteur d'échelle  $\lambda=2.0$ , la précision de mesure est deux fois plus grande pour  $D_{CH}$  par rapport à  $D_{NH}$  permettant ainsi de compenser partiellement les différentes forces d'interaction dipolaire ( $D_{CH}^{max} = 0.3D_{NH}^{max}$ ). Ainsi le poids des deux contraintes structurales lors d'un calcul de structure est comparable.

## 5 Application à l'étude structurale du domaine N-terminal de la réductase mercurique de *Ralstonia metallidurans*

Nous avons appliqué cette nouvelle stratégie RMN exposée aux chapitres précédents à la détermination rapide du repliement de différentes protéines. Le premier exemple concerne le domaine N-terminal (67 résidus) de la réductase mercurique de *Ralstonia metallidurans* CH34 (MerAa), qui va être présenté en détail dans ce chapitre. L'acquisition rapide des données RMN s'est aussi avérée extrêmement utile pour l'étude du domaine PB1 (83 résidus) de la protéine p67<sup>phox</sup> humaine, impliquée dans l'activation de la NADPH oxydase. Ce fragment protéique n'est stable que quelques jours en solution. Grâce aux expériences présentées dans les chapitres précédents, un jeu complet de données RMN a pu être obtenu pour un seul échantillon de la protéine permettant le calcul du repliement de ce domaine PB1 en solution <sup>[61]</sup>. Finalement, l'applicabilité de cette méthodologie aux protéines de taille plus importantes a été démontrée pour le domaine de liaison FMN de la sulfite réductase d'*E. coli* (167 résidus). L'attribution complète des résonances de la chaîne principale, ainsi qu'un jeu de couplages dipolaires résiduels mesuré dans deux milieux anisotropes ont permis de valider et de raffiner un modèle structural basé sur la structure d'une protéine homologue <sup>[37,62]</sup>. De nouveau, toutes les expériences RMN ont pu être enregistrées dans un délai inférieur à 2 jours.

### 5.1 Contexte biologique de la réductase mercurique

La toxicité du mercure est due à la capacité du cation mercurique d'interagir avec des thiols, comme, par exemple les cystéines dans les protéines. Cependant, beaucoup de bactéries sont capables de résister à des concentrations fortes de ce métal toxique. Le mécanisme principal de cette résistance implique le transport actif du  $Hg^{2+}$  à travers la membrane cytoplasmique et sa réduction à l'intérieur de la cellule sous forme Hg beaucoup plus inerte et volatile. Plusieurs protéines (MerA, MerP et MerT) participent à ce processus dont les gènes correspondants sont regroupés dans l'opéron mer <sup>[63]</sup>.

La réductase du mercure (MerA) peut posséder un ou deux domaines N-terminaux, appelés MerAa, qui montrent une forte homologie de séquence avec la protéine périplasmique MerP. La structure tridimensionnelle de MerA a été déterminée par cristallographie aux rayons X <sup>[64]</sup>, mais il a été impossible d'obtenir des informations structurales sur l'extension N-terminale, certainement à cause de sa flexibilité par rapport au reste de la protéine. La fonction de ce domaine n'est pas connue. Cependant, la présence d'un motif de fixation du métal, GMTCCXXC, et la topologie des éléments de structure secondaire, suggèrent que MerAa fait partie d'une famille de protéines regroupant des transporteurs de métaux tels que CopZ, MerP, ou Atx1 <sup>[65]</sup>. Le but de cette étude RMN entreprise en collaboration avec Jacques Covès à l'IBS (laboratoire des protéines membranaires) était de confirmer cette homologie structurale et de vérifier l'existence de



la liaison de l'ion mercurique par les deux cystéines conservées, afin de mieux comprendre le rôle fonctionnel de ce domaine dans le mécanisme de résistance au mercure.

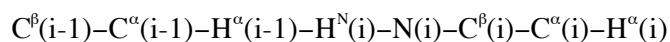
## 5.2 Attribution et structure secondaire de MerAa

Dans un premier temps, l'attribution des résonances  $H^N$ , N,  $C^\alpha$ ,  $H^\alpha$ , et  $C^\beta$  le long de la chaîne peptidique a été obtenue à partir des 6 expériences (3,2)-D H-N-X unidirectionnelles introduites au sous-chapitre 3.1. L'attribution a été ensuite étendue aux noyaux CO à l'aide de l'expérience ((3,2)+1)-D J-HNCO(H) présentée au sous-chapitre 4.3, permettant en même temps la mesure des deux couplages  $J_{NH}$  et  $J_{CH}$  en milieu isotrope. Des jeux de spectres ont été enregistrés sur un échantillon de MerAa en absence de métal, puis sur un deuxième échantillon contenant la protéine MerAa et du sel  $HgCl_2$  au rapport molaire de 1:1.2. Les deux échantillons de la protéine ont été préparés à une concentration d'environ 1.5mM dans un tampon de TRIS-HCl a pH=7.0. Les temps d'acquisition des différentes expériences enregistrées sur un spectromètre 600MHz équipé d'une sonde triple-résonance (non cryogénique) sont résumés dans le tableau ci-dessous.

Expérience	Noyaux détectés	Facteur d'échelle $\lambda$	Temps expérimental
<i>intra</i> -HNCA	$^1H, ^{15}N, ^{13}C^\alpha(i)$	1.0	40min
<i>seq</i> -HNCA	$^1H, ^{15}N, ^{13}C^\alpha(i-1)$	1.0	20min
<i>intra</i> -HNHA	$^1H, ^{15}N, ^1H^\alpha(i)$	1.0	3h
<i>seq</i> -HNHA	$^1H, ^{15}N, ^1H^\alpha(i-1)$	1.0	1h30
<i>intra</i> -HNCB	$^1H, ^{15}N, ^{13}C^\beta(i)$	0.5	5h20
<i>seq</i> -HNCB	$^1H, ^{15}N, ^{13}C^\beta(i-1)$	0.5	2h40
J-HNCO(H)	$^1H, ^{15}N, ^{13}C'$	2.0	45min

TABLEAU 2. Expériences utilisées pour l'attribution séquentielle rapide de la protéine MerAa (1.5mM). Toutes les expériences ont été enregistrées à 600MHz et 25°C.

Le temps d'acquisition total de ces expériences est de moins de 15 heures par échantillon. Les spectres ont été attribués par une suite de programme en langage C exploitant la symétrie des pics de projection par rapport aux *pics centraux* extraits d'un spectre de corrélation  $^1H$ - $^{15}N$  HSQC. Tant qu'il n'y a pas de superposition dans le spectre de corrélation  $^1H$ - $^{15}N$ , le résultat de cette analyse spectrale est une liste de fréquences corrélées correspondant à des segments peptidiques :



Pour les résidus glycines, la fréquence  $C^\beta$  est remplacée par la fréquence du deuxième noyau  $H^\alpha$ . L'attribution séquentielle de ces segments a ensuite été réalisée par le programme ALPS développé au laboratoire <sup>[66]</sup>. Un spectre  $^1H$ - $^{15}N$  attribué pour les deux formes de MerAa est montré dans les figures 34a et 34b.

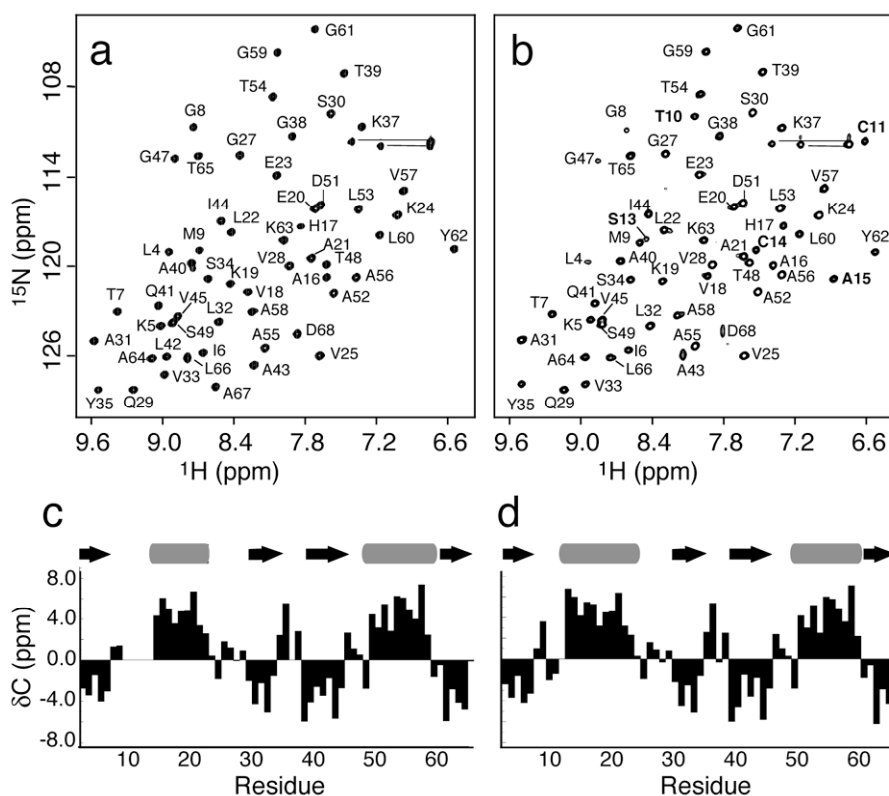


FIGURE 34. Spectres de corrélation  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  attribués de (a) la forme apo de MerAa et (b) du complexe MerAa-Hg(II). L'identification des éléments de structure secondaire à partir de déplacements chimiques secondaires pour les deux formes est montrée en (c) et (d).

Une fois l'attribution séquentielle connue, l'analyse des déplacements chimiques des  $\text{C}^\alpha$  et CO a permis de localiser les éléments de structure secondaire. Le déplacement chimique secondaire  $\delta\text{C}$  est défini comme la différence de la fréquence mesurée et une valeur moyenne dépendante du type d'acide aminé [67]. Dans les graphes de la figure 34, les  $\delta\text{C}$  calculés pour les noyaux  $\text{C}^\alpha$  et CO d'un même résidu ont été additionnés. Des valeurs de  $\delta\text{C}$  positives sont indicatives d'une hélice, tandis que des valeurs négatives sur plusieurs résidus correspondent à une structure étendue (brin  $\beta$ ). La topologie de type "ferredoxine"  $\beta$ - $\alpha$ - $\beta$ - $\beta$ - $\alpha$ - $\beta$  confirme l'homologie de MerAa avec d'autres transporteurs de métaux.

### 5.3 Détermination du repliement global de MerAa

Pour la détermination du repliement global, différentes approches sont envisageables : dans le cas où la structure à haute résolution d'une protéine homologue est connue, l'obtention d'un jeu de contraintes orientationnelles (RDC) permet de valider ou d'invalider ce modèle. Dans un premier temps, les deux couplages par plan peptidique, mesurés à l'aide d'une expérience ((3,2)+1)-D J-HNCO(H) projetée et filtrée sur un échantillon de MerAa en solution anisotrope, nous ont permis de démontrer que MerAa et la protéine homologue Ccc2a de la levure possèdent le même repliement [34]. L'avantage de cette méthode est qu'elle est rapide et qu'elle ne nécessite aucune attribution des chaînes latérales.

Nous avons aussi effectué un calcul de structure *de novo*, c'est-à-dire sans utiliser la structure d'un homologue, en suivant la stratégie exposée au chapitre 4. Les groupements méthyle ont été d'abord attribués à partir d'un spectre ((4,2)+1)-D DEPT-CT-HC(CO)NH-TOCSY (voir sous-chapitre 3.2). Ensuite 58 distances méthyle-méthyle à longue portée ont pu être détectées grâce à l'expérience (2<sub>cs</sub>+2<sub>aa</sub>)-D NOESY (voir sous-chapitre 4.2). Le calcul de la structure a été effectué en deux étapes. Le programme Discover (Accelrys Inc.) a été utilisé pour calculer le repliement de la chaîne principale à partir des 58 contraintes de distances méthyle-méthyle, de 62 contraintes d'angles dièdres pour les régions de structure secondaire identifiées à partir des déplacements chimiques <sup>13</sup>C, et 47 contraintes pour les liaisons hydrogènes, basées sur l'observation de NOE H<sup>N</sup>-H<sup>N</sup>. Le rmsd calculé sur les N, C<sup>α</sup> et C' des résidus 4 à 66 était de 1.16 Å (Figure 35a). Une étape d'affinement de la conformation de la chaîne principale a été ensuite effectuée en utilisant le programme Sculptor, développé au laboratoire <sup>[68]</sup>, et un jeu de contraintes comprenant 99 RDC mesurés sur la chaîne principale. L'ensemble de structures ainsi obtenues est caractérisé par un rmsd de 0.91 Å (Figure 35b).

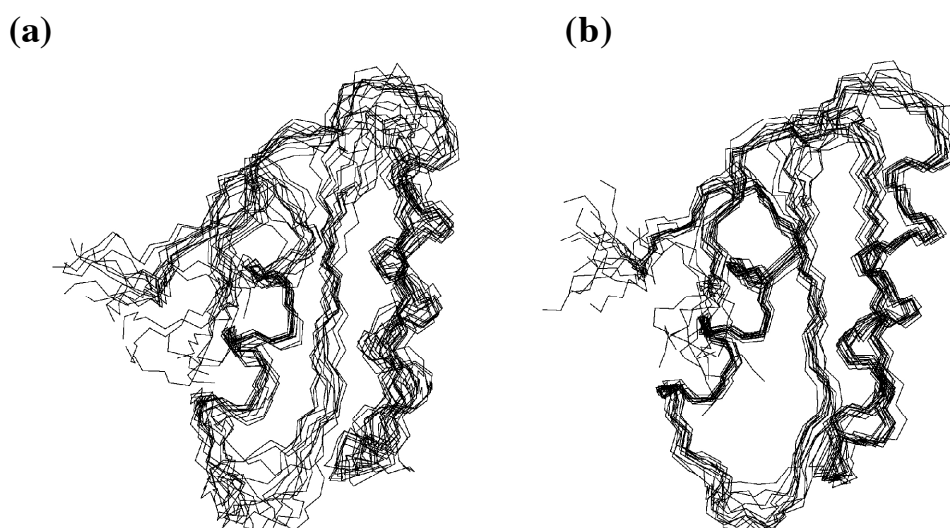


FIGURE 35. Repliement de MerAa. (a) Ensemble de 15 structures calculé avec les contraintes suivantes : 56 NOE méthyle-méthyle, 62 angles dièdres (éléments de structure secondaire) et 47 liaisons hydrogènes (éléments de structure secondaire et appariement des brins  $\beta$  anti-parallèles). (b) Ensemble après affinement utilisant le programme Sculptor avec 99 contraintes orientationnelles (RDC) supplémentaires.

#### 5.4 Site de fixation du mercure

Le site de fixation du mercure de la protéine peut être identifié en comparant les déplacements chimiques H<sup>N</sup> et N mesurés pour les deux formes *apo* et complexée avec Hg(II) de MerAa (figures 34a et 34b). La somme pondérée des différences de fréquences

$\Delta = \sqrt{(\Delta\omega_{H^N})^2 + \gamma_N/\gamma_H(\Delta\omega_N)^2}$  est tracée dans la figure 36b en fonction de la séquence peptidique.

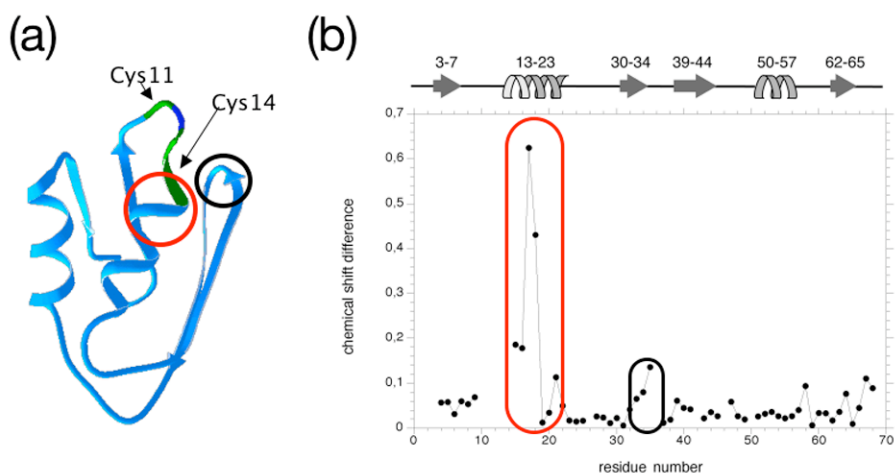


FIGURE 36. (a) site de fixation du mercure, comme identifié par (b) les différences de déplacement chimique  $H^N$  et  $N$  entre la forme MerAa apo et le complexe MerAa-Hg(II).

Un changement significatif de déplacement chimique est observé pour deux régions de la chaîne peptidique, la boucle et le début de la première hélice  $\alpha$  contenant les cystéines C11 et C14 et la fin du deuxième brin  $\beta$  (résidus 34 et 35). Dans la structure de MerAa, ces deux régions sont proches de la boucle contenant les deux résidus cystéine supposés être les ligands du métal. Aucun pic de corrélation  $^1H$ - $^{15}N$  n'a pu être observé pour les résidus T10-A15 dans la forme apo de la protéine, indiquant une grande flexibilité et accessibilité au solvant dans cette région. Toutes ces observations indiquent clairement que les deux résidus cystéines C11 et C14 sont impliqués dans la coordination du métal. Il est intéressant de noter que les résidus proches de l'ion mercurique gardent une certaine flexibilité conformationnelle, reflétée par un élargissement des largeurs de raie des  $^1H$  amides et l'observation de pics intenses d'échange avec les  $^1H$  de l'eau. Cette flexibilité pourrait avoir un rôle important dans la fonction de ce fragment protéique au sein de la réductase mercurique.

## 6 Perspectives (projets de recherche)

Dans ce dernier chapitre, je vais brièvement exposer un certain nombre de projets, qui pour la plupart ont déjà démarré au laboratoire. Certains de ces projets peuvent être considérés comme la suite des travaux présentés dans les chapitres précédents, d'autres n'ont pas de lien direct mais donnent un aperçu de mes différents centres d'intérêt en RMN biomoléculaire.

### 6.1 Méthodes rapides pour le raffinement structural de protéines

Dans les chapitres précédents, de nouvelles expériences RMN ont été présentées permettant la détermination rapide du repliement global de protéines. La suite logique de ces travaux est d'étendre cette stratégie à l'affinement de la structure, c'est-à-dire le positionnement correct dans l'espace de toutes les chaînes latérales. Pour cela deux pistes complémentaires seront exploitées.

La première se base sur l'analyse de spectre 2D  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  NOESY. L'utilisation d'un spectromètre à très haut champ ( $B_0 > 18\text{T}$ ), équipé d'une sonde cryogénique (installée au laboratoire avant la fin de l'année 2004) et d'un échantillon de la protéine ( $\approx 1\text{mM}$ ) non enrichi en isotopes  $^{13}\text{C}$  et  $^{15}\text{N}$  permettra l'acquisition de spectres d'une bonne résolution spectrale et d'un bon rapport S/N en quelques heures. Un protocole itératif, comme implémenté dans le programme ARIA<sup>[47]</sup> basé sur la structure RMN à basse résolution de la protéine (repliement global) devrait ensuite permettre l'attribution d'un suffisamment grand nombre de corrélations NOE pour affiner la structure. Il sera aussi particulièrement intéressant d'évaluer la performance d'un tel protocole dans le cas d'une attribution incomplète des  $^1\text{H}$  des chaînes latérales. Le traitement alternatif des données NOESY par une analyse statistique, comme proposée par R. Brüschweiler et ses collaborateurs<sup>[17,18]</sup> (voir aussi sous-chapitre 2.1), permettra d'augmenter d'avantage la résolution spectrale dans la dimension indirecte du spectre NOESY, et pourrait aider à identifier les  $^1\text{H}$  formant un réseau de spins couplés entre eux (*modes propres*), autrement dit qui sont proches dans l'espace. Le potentiel de cette nouvelle méthode dans le contexte d'un affinement de structure sera évalué en collaboration avec le group de R. Brüschweiler à l'université de Worcester (USA).

En complément (ou en alternative) aux données NOE  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ , des RDC seront mesurés pour un grand nombre de vecteurs internucléaires, notamment  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  dans les chaînes latérales. Des expériences RMN ont été proposées dans le passé pour la mesure précise et fiable de ces paramètres spectraux<sup>[69]</sup>. Ces expériences s'appliquent facilement aux protéines de petite taille avec un spectre de corrélation  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  relativement bien résolu. Pour des protéines de taille plus élevée des méthodes plus sophistiquées seront nécessaires afin de résoudre dans le spectre les différents sites C-H dans la molécule. L'implémentation de ces données en tant que contraintes structurales se fera en collaboration avec M. Blackledge à l'IBS (Grenoble) dans le programme Sculptor développé au laboratoire<sup>[68]</sup>. L'utilisation conjointe des données NOE et RDC ne devrait pas seulement permettre d'affiner la structure mais aussi d'obtenir des informations précieuses sur

la dynamique des chaînes latérales, et notamment sur la population des différents états rotamériques. Une étude préliminaire effectuée au laboratoire (Laura Radu, stage de maîtrise), sur l'utilisation des RDC pour le raffinement des chaînes latérales de la protéine MerAa a donné des premiers résultats prometteurs.

## 6.2 *Application des techniques de RMN projetée ou filtrée à l'étude structurale d'acides nucléiques*

Les acides nucléiques (ADN, ARN) forment une deuxième classe importante de macromolécules biologiques dont les propriétés structurales et dynamiques sont étudiées par RMN. Le problème majeur d'une étude RMN d'un acide nucléique, polymère formé par seulement 4 nucléotides différents, est la résolution réduite dans les spectres par rapport à une protéine de même taille. En conséquence, il est d'autant plus important de corrélérer et d'éditer les fréquences d'un nombre élevé de spins nucléaires dans une même expérience afin d'augmenter la résolution du spectre. Jusqu'alors les concepts d'acquisition rapide de spectres multidimensionnels, résumés au chapitre 2, ont été peu appliqués dans le domaine de la RMN des acides nucléiques. Ceci s'explique principalement par la faible sensibilité d'un grand nombre d'expériences de corrélation RMN appliquées aux acides nucléiques de grande taille. Avec la disponibilité de spectromètres à très haut champ et de sondes cryogéniques cette situation est en train de changer. Il devient alors intéressant pour l'étude de molécules d'ADN ou d'ARN de disposer d'expériences RMN offrant une bonne résolution spectrale (dimensionnalité élevée) dans un temps d'acquisition raisonnable de quelques heures à quelques jours. Dans un premier temps, nous avons commencé au laboratoire à appliquer les concepts de la RMN projetée et de la RMN filtrée aux expériences de corrélation de type HCN et HCC, qui sont requises pour l'attribution des résonances  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  et  $^{15}\text{N}$  dans les bases et les sucres. Ce projet sera mené par H. Van Melckebeke (thèse au laboratoire) en collaboration avec J.-P. Simorre et J. Boisbouvier à l'IBS (Grenoble) et deux collaborateurs extérieurs, A. Pardi (Univ. du Colorado USA) et F. Dardel (Univ. Paris). Trois systèmes ARN sont actuellement disponibles au laboratoire pour tester et appliquer les nouvelles expériences développées: un aptamère d'ARN (33 nucléotides) formant un complexe avec la théophylline, un ARN de transfert (76 nucléotides) et un complexe formé par l'ARN TAR et son aptamère (2× 16 nucléotides).

## 6.3 *L'étude structurale par RMN de protéines de plus grande taille*

À ce jour, les structures RMN déposées dans la PDB (*protein data bank*) concernent des protéines de moins de 300 résidus. Bien que récemment les premières études RMN de protéines excédant cette taille aient été reportées dans la littérature <sup>[70]</sup>, le développement de méthodes RMN robustes pour l'étude de protéines de plus de 30kDa reste un axe de développement important. Pour cela, nous envisageons de mettre au point une série d'expériences corrélant les fréquences de 4 ou 5 noyaux dans le même spectre, permettant ainsi l'attribution des résonances d'une protéine triplement marquée ( $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ ,  $^2\text{H}$ ). L'enregistrement de spectres à 4 ou 5 dimensions s'impose afin de résoudre les superpositions dues aux dégénérescences de fréquence de plus en plus nombreuses quand le nombre de résidus augmente. Afin de limiter le temps d'acquisition de telles

expériences 4D ou 5D, il est indispensable de recourir aux méthodes d'acquisition rapide (chapitre 2), notamment la RMN projetée. Il sera aussi crucial de déterminer les expériences et les chemins de cohérence les plus sensibles et les plus complémentaires. D'autres paramètres à optimiser sont le nombre et le choix des angles de projection. Des outils seront développés pour traiter et analyser ces spectres projetés.

Dans un deuxième temps, nous allons exploiter différentes méthodes pour collecter des contraintes structurales. Alors que la mesure de RDC le long de la chaîne peptidique est maintenant une méthode bien établie pour obtenir des contraintes structurales dans de tels systèmes moléculaires, il est plus difficile d'obtenir des informations sur la proximité de deux noyaux dans l'espace. Le manque de  $^1\text{H}$  dans une protéine perdeutérée et la difficulté pour attribuer les  $^1\text{H}$  dans une protéine protonée, rendent les expériences  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  NOESY peu utiles. Une solution à ce problème a été proposée récemment par le group de L. Kay à l'université de Toronto (Canada). En ré-introduisant sélectivement les protons de certains groupements méthyles par un protocole de marquage spécifique, la mesure de NOE  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  permet de déterminer les proximités de différents méthyles dans la structure. Ceci fournit des contraintes de distance à longue portée nécessaires au calcul du repliement global. Alternativement, on peut envisager d'autres approches, par exemple la mesure de NOE ou RDC  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  à longue portée dans une protéine où le nombre de noyaux à spins  $S=1/2$  a été fortement réduit par remplacement isotopique, ou l'attachement d'un ion paramagnétique donnant accès à des informations sur l'orientation et la distance d'un groupement d'atomes par rapport au centre paramagnétique (voir sous-chapitre 6.4).

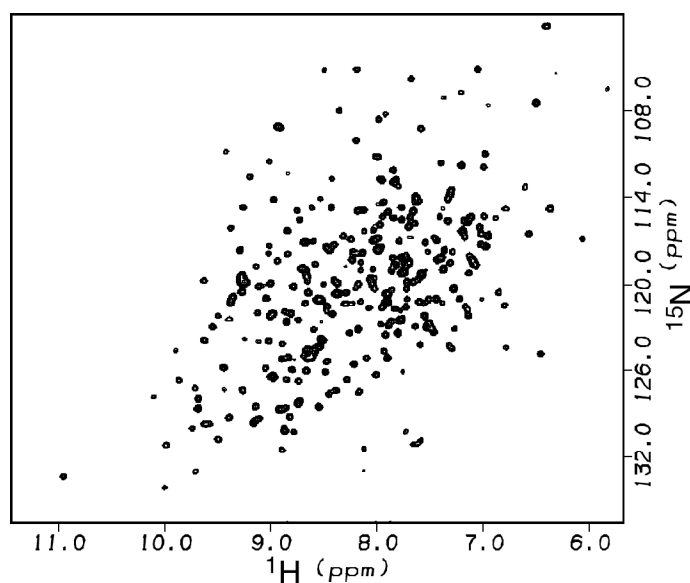


FIGURE 37. Spectre de corrélation  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  de la protéine T de *Thermotoga Maritima* enregistré à 600MHz et 40°C.

Tous ces développements seront mis au point et appliqués à la protéine T du complexe de la glycine décarboxylase. Ce complexe est constitué de 4 composantes protéiques (P, H, T et L) qui réalisent un cycle catalytique permettant la dégradation de molécules de glycine. La protéine H du complexe de la glycine décarboxylase a récemment été étudiée au laboratoire <sup>[71]</sup> en terme

de structure et de dynamique dans ces différents états lors du cycle catalytique. La protéine T, constituée d'une chaîne peptidique de 360 résidus (40kDa), est un excellent système modèle d'une protéine de grande taille à l'échelle de la RMN. De plus, aucune structure de cette protéine ou d'une protéine homologue n'est connue à ce jour. Les informations structurales ou dynamiques obtenues par RMN seront donc d'une grande importance pour la compréhension de l'activité physiologique de cette enzyme. Ce projet sera réalisé avec P. Gans et J.-P. Simorre à l'IBS (Grenoble) en collaboration avec N. Rouhier et J.-P. Jacquot (Univ. de Nancy). La surexpression de la protéine a été réalisée récemment dans le laboratoire de J.-P. Jacquot, et les premiers spectres RMN (voir Fig. 37) indiquent qu'il s'agit d'une protéine repliée, soluble à une concentration de l'ordre du mM et stable sur plusieurs jours à 50°C.

A terme ces développements devraient permettre des études structurales par RMN de protéines membranaires solubilisées dans des détergents lipidiques (micelles) formant des particules de plus de 50kDa.

#### 6.4 Contraintes structurales à très longue portée pour l'étude structurale de complexes moléculaires

La fonction principale des macromolécules biologiques est d'interagir entre elles. Certaines molécules ne deviennent actives que dans un assemblage supramoléculaire. Il est alors important de posséder des méthodes expérimentales pour déterminer la position relative de chaque molécule au sein d'un complexe fonctionnel (structure quaternaire). En général, ces complexes moléculaires ont une taille (>100kDa) qui dépasse largement les limites de la RMN structurale. Il n'est alors plus question d'obtenir une attribution complète, et encore moins une structure d'un tel complexe. Cependant, en utilisant un marquage spécifique rendant seulement un petit nombre de noyaux observables, des expériences optimisées permettent d'enregistrer des spectres RMN bien résolus d'une molécule ou d'un complexe d'un poids moléculaire allant jusqu'à quelques centaines de kDa (voir figure 38).

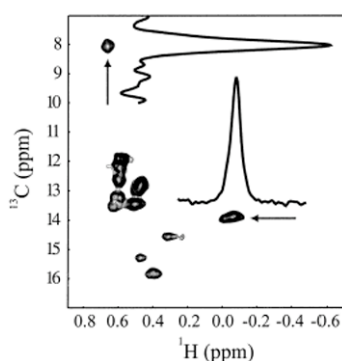


FIGURE 38. Spectre de corrélation  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  de la protéine tétradécamerique ClpP (305kDa). Seuls les méthyles à la position  $\delta$  des isoleucines sont observables. Temps expérimental 100min sur un spectromètre 800MHz [72].

Les noyaux ainsi détectés dans le spectre RMN fournissent des sondes locales de structure et de dynamique dans la molécule. Notre projet consiste à mesurer un certain nombre de paramètres RMN contenant des informations structurales sur le complexe. Une première approche est basée



sur la mesure de couplages dipolaires résiduels (RDC) induits quand la molécule est placée dans un milieu anisotrope. Si les deux noyaux  $^1\text{H}$  et  $\text{X}$  ( $^{13}\text{C}$  ou  $^{15}\text{N}$ ) d'un groupement  $\text{X-H}$  sont observables, et si un marquage isotopique spécifique est effectué pour différentes molécules du complexe (dans le même échantillon ou dans différents échantillons), la mesure de RDC  $D_{\text{XH}}$  renseigne sur l'orientation relative des différentes molécules. Des informations complémentaires sont obtenues par la mesure de RDC  $D_{\text{HH}}$  intermoléculaires. Il a été montré récemment <sup>[73]</sup> que des RDC sont détectés entre protons éloignés de plus de  $10\text{\AA}$ , pourvu que le réseau de spins couplés soit suffisamment simplifié par un marquage isotopique adéquat et l'application d'impulsions rf sélectives. En plus de l'information orientationnelle, les paramètres  $D_{\text{HH}}$  fournissent une contrainte de distance entre deux molécules du complexe.

Une deuxième approche consiste à attacher un ion paramagnétique à un site spécifique d'une des molécules, et à introduire des sondes RMN dans une autre molécule du complexe par marquage isotopique. La présence d'un centre paramagnétique attaché d'une manière rigide à la molécule induit un faible alignement dans le champ magnétique, permettant la mesure de RDC, ainsi qu'un déplacement paramagnétique des résonances d'un spin nucléaire dû à l'interaction dipolaire avec le spin électronique. Un troisième effet observable est dû à la corrélation croisée entre l'interaction dipolaire de deux spins nucléaires et d'un spin nucléaire avec l'aimantation Curie du spin électronique. Dans le passé, nous avons pu montrer l'utilité de ce paramètre pour la détermination structurale par RMN <sup>[74]</sup>. L'attachement d'un centre paramagnétique est particulièrement attractif dans le contexte d'un complexe moléculaire, où les noyaux observés sont relativement éloignés de l'ion paramagnétique. Ainsi la vitesse de relaxation transversale des spins nucléaires (élargissement paramagnétique) est peu affectée par la présence du centre paramagnétique, alors que les déplacements paramagnétiques et les effets de corrélation croisée Curie-dipolaire restent observables (figure 39).

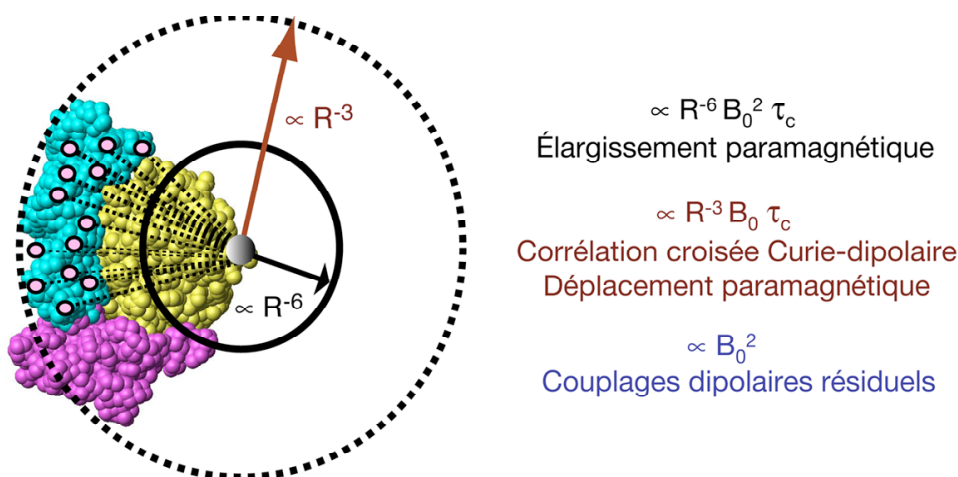


FIGURE 39. Paramètres RMN observables en présence d'un centre paramagnétique et leur dépendance de la distance par rapport à l'ion paramagnétique  $R$ .

Les lanthanides sont les ions les plus adaptés à une telle étude, à cause d'une relaxation électronique rapide et de leur susceptibilité magnétique élevée. Le choix de différents ions lanthanides paramagnétiques ( $\text{Yb}^{3+}$ ,  $\text{Tb}^{3+}$ ,  $\text{Dy}^{3+}$ ,  $\text{Ho}^{3+}$ ) et du champ magnétique permet d'ajuster les

rayons des deux cercles de la figure 39 au système moléculaire étudiée, c'est-à-dire la distance entre le centre paramagnétique et les spins nucléaires observés. Dans un complexe moléculaire d'une centaine de kDa, des effets peuvent ainsi être observés à des distances du centre paramagnétique allant jusqu'à 30-50Å. Des sites de fixation à haute affinité d'un lanthanide peuvent être créés soit par modification chimique d'un résidu cystéine dans une protéine ou thio-uridine (thio-cytidine) dans un acide nucléique <sup>[75]</sup>, soit par voie biochimique en rajoutant une séquence peptidique spécifique (par exemple une "main EF") au niveau du vecteur d'expression de la protéine <sup>[76]</sup>, permettant ainsi la coordination d'un ion lanthanide.

Cette méthodologie sera développée en collaboration avec J. Boisbouvier et J.-P. Simorre à l'IBS (Grenoble) et, dans un premier temps, appliquée et testée sur deux systèmes modèles de complexes entre une protéine et un acide nucléique. Le premier complexe est constitué d'un ARN Box B (19 nucléotides) et d'un peptide de 24 résidus auquel a été ajouté à son N terminal un motif "main EF" (collaboration avec P. Legault, Université de Montréal, Canada). Le deuxième est une protéine de résistance aux antibiotiques, BlaI (85 résidus), en interaction avec un 12-mer d'ADN double brin auquel ont été ajoutés 2 paires de bases permettant la fixation d'un groupement EDTA (collaboration avec B. Joris, Université de Liège, Belgique). Une fois la méthodologie mise au point, nous envisageons son application à des systèmes moléculaires plus complexes.

### *6.5 Utilisation de la RMN solide pour l'étude de systèmes moléculaires insolubles*

L'étude structurale de protéines par RMN en phase solide est un domaine de recherche en pleine expansion, ayant récemment donné lieu à la première structure de protéine par cette technique <sup>[77]</sup>. La RMN solide devrait permettre à terme d'obtenir des informations structurales et dynamiques sur des systèmes moléculaires insolubles et dont la cristallisation s'avère difficile. L'utilisation de ces méthodes sur les protéines membranaires représente un domaine d'application particulièrement important. Actuellement beaucoup d'efforts sont investis au niveau du développement méthodologique en RMN solide des protéines en vue d'augmenter la résolution et la sensibilité des expériences de corrélation. Nous avons commencé récemment une collaboration avec L. Emsley et S. Hediger du groupe de RMN solide à l'ENS Lyon afin de bénéficier de nos compétences complémentaires pour le développement d'expériences en RMN solide des protéines. Le premier résultat de cette collaboration a été la mise au point d'une nouvelle expérience de corrélation <sup>13</sup>C-<sup>13</sup>C permettant un gain significatif de résolution spectrale <sup>[78]</sup>, particulièrement importante pour l'étape d'attribution des résonances de la protéine. La base de cette expérience est une technique, bien connue en RMN liquide qui permet la sélection et la détection d'une seule transition d'un système de spins couplés dans le spectre (une seule ligne du multiplet). Cette expérience a été adaptée aux particularités de la RMN solide. On peut s'attendre à ce que d'autres concepts récents développés en RMN liquide des biomolécules seront également utiles en RMN solide des protéines. Des recherches dans ce sens seront poursuivies au laboratoire. Il sera aussi particulièrement intéressant d'explorer la complémentarité des deux techniques, RMN liquide et

RMN solide, pour l'étude de protéines membranaires dissoutes dans des micelles lipidiques (pour la RMN liquide) ou en forme microcristalline (pour la RMN solide).

## Annexe: les matrices G et les matrices Hadamard

Les matrices  $G_{2^k}$  nécessaires à la transformation des expériences projetées  $(n,k)$ -D sont obtenues de manière itérative à partir de deux matrices à 2 dimensions,  $G_2$  et  $\overline{G_2}$  :

$$G_2 = \begin{pmatrix} 1 & 0 \\ 0 & 1 \end{pmatrix} \quad \overline{G_2} = \begin{pmatrix} 0 & -1 \\ 1 & 0 \end{pmatrix} \quad [\text{A-1}]$$

Les matrices  $G_{2^k}$  avec  $K > 1$  sont ensuite construites en appliquant les règles d'expansion suivantes :

$$G_{2^{(k+1)}} = \begin{pmatrix} G_{2^k} & \overline{G_{2^k}} \\ G_{2^k} & -\overline{G_{2^k}} \end{pmatrix} \quad [\text{A-2}]$$

$$\overline{G_{2^{(k+1)}}} = \begin{pmatrix} \overline{G_{2^k}} & -G_{2^k} \\ G_{2^k} & G_{2^k} \end{pmatrix} \quad [\text{A-3}]$$

avec  $G_{2^{(k+1)}}$  la matrice G utilisée pour la transformation des données  $(n,k)$ -D et  $\overline{G_{2^{(k+1)}}}$  une matrice G complémentaire nécessaire à la création de la matrice  $G_{2^{(k+2)}}$ . Le signe "-" devant une matrice indique que le signe de tous les éléments de la matrice est inversé.

D'une manière très similaire, la sous-famille des matrices Hadamard  $H_N$  contenant les matrices d'ordre  $N=2^j$  avec  $j$  un nombre entier, peut être créée de manière itérative à partir de la matrice  $H_2$

$$H_2 = \begin{pmatrix} +1 & +1 \\ +1 & -1 \end{pmatrix} \quad [\text{A-4}]$$

en appliquant le développement suivant :

$$H_{2^{(j+1)}} = \begin{pmatrix} H_{2^j} & H_{2^j} \\ H_{2^j} & -H_{2^j} \end{pmatrix} \quad [\text{A-5}]$$

avec  $-H_{2^j}$  la matrice  $H_{2^j}$  avec tous les éléments inversés en signe.

## 7 Références

1. (a) Purcell, E.M., Torrey, H. G., Pound, R. V. *Phys. Rev.* **1946**, 69, 37-38; (b) Bloch, F., Hansen, W., Packard, M.E. *Phys. Rev.* **1946**, 69, 127; (c) Bloch, F. *Phys. Rev.* **1946**, 70, 460-474.
2. (a) Ernst, R.R., Anderson, W.A. *Rev.Sci. Instrum.* **1966**, 37, 93-102; (b) Ernst, R.R. *Adv. Magn. Reson.* **1966**, 2, 1.
3. (a) Jeener, J. *Ampère International Summer School (Basko Polje)* **1971**, non publié; (b) Aue W. P., Bartholdi E. and Ernst R. R., *J. Chem. Phys.* **1976**, 64, 2229-2246.
4. Williamson M. P., Havel T. F. and Wüthrich K., *J. Mol. Biol.* **1985**, 182, 295-315.
5. (a) Tolman J. R., Flanagan J. M., Kennedy M. A. and Prestegard J. H., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1995**, 92, 9279-9283; (b) Tjandra N. and Bax A., *Science* **1997**, 278, 1111-1114.
6. (a) Pervushin K., Riek R., Wider G. and Wüthrich K., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1997**, 94, 12366-12371; (b) Pervushin K., Riek R., Wider G. and Wüthrich K., *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, 120, 6394-6400; (c) Brutscher B., Boisbouvier J., Pardi A., Marion D. and Simorre J. P., *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, 120, 11845-11851. (d) Brutscher B., *Concepts in Magn. Reson.* **2000**, 12, 207-229. (e) Riek R., Pervushin K. and Wüthrich K., *Trends Biochem. Sci.* **2000**, 25, 462-468.
7. (a) Dingley A. J. and Grzesiek S., *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, 120, 8293-8297; (b) Grzesiek S., Barfield M., Cordier F., Dingley A., Feigon J. and Nicholson L. K., *Biochemistry* **2000**, 39, 1562-1562; (c) Cordier F., Rogowski M., Grzesiek S. and Bax A., *J. Magn. Reson.* **1999**, 140, 510-512.
8. Vanbelle C., Brutscher B., Blackledge M., Muhle-Goll C., Remy M. H., Masson J. M. and Marion D., *Biochemistry* **2003**, 42, 651-663.
9. Mueller G. A., Choy W. Y., Yang D. W., Forman-Kay J. D., Venters R. A. and Kay L. E., *J. Mol. Biol.* **2000**, 300, 197-212.
10. Arora A., Abildgaard F., Bushweller J. H. and Tamm L. K., *Nat. Struct. Biol.* **2001**, 8, 334-338.
11. Fernandez C., Hilty C., Wider G., Guntert P. and Wüthrich K., *J. Mol. Biol.* **2004**, 336, 1211-1221.
12. Gesmar H. and Led J. J., *J. Magn. Reson.* **1989**, 83, 53.64.
13. (a) Hoch J. C. and Stern A. S., in *Nuclear Magnetic Resonance of Biological Macromolecules* **2001**; 159-178 (b) Rovnyak D., Filip C., Itin B., Stern A. S., Wagner G., Griffin R. G. and Hoch J. C., *J. Magn. Reson.* **2003**, 161, 43-55.
14. (a) Hu H. T., De Angelis A. A., Mandelshtam V. A. and Shaka A. J., *J. Magn. Reson.* **2000**, 144, 357-366; (b) Chen J. H., Nietlispach D., Shaka A. J. and Mandelshtam V. A., *J. Magn. Reson.* **2004**, 169, 215-224.
15. Marion D., *J. Biomol. NMR* **2005**, in press.

- 
16. Dutt A. and Rokhlin V, *Appl. Comp. Harm. Anal.* **1995**, 2, 85-100.
  17. (a) Brüschweiler R. and Zhang F. L., *J. Chem. Phys.* **2004**, 120, 5253-5260; (b) Brüschweiler R., *J. Chem. Phys.* **2004**, 121, 409-414.
  18. Zhang F. L. and Brüschweiler R., *Chemphyschem* **2004**, 5, 794-796.
  19. Bodenhausen G. and Ernst R. R., *J. Am. Chem. Soc.* **1982**, 104, 1304-1309.
  20. (a) Szyperski T., Wider G., Bushweller J. H. and Wüthrich K., *J. Biomol. NMR* **1993**, 3, 127-132; (b) Szyperski T., Wider G., Bushweller J. H. and Wüthrich K., *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, 115, 9307-9308; (c) Simorre J. P., Brutscher B., Caffrey M. S. and Marion D., *J. Biomol. NMR* **1994**, 4, 325-333; (d) Brutscher B., Simorre J. P., Caffrey M. S. and Marion D., *J. Magn. Reson. B* **1994**, 105, 77-82; (e) Szyperski T., Pellecchia M. and Wüthrich K., *J. Magn. Reson. B* **1994**, 105, 188-191; (f) Brutscher B., Cordier F., Simorre J. P., Caffrey M. and Marion D., *J. Biomol. NMR* **1995**, 5, 202-206; (g) Brutscher B., Morelle N., Cordier F. and Marion D., *J. Magn. Reson. B* **1995**, 109, 238-242; (h) Szyperski T., Braun D., Banecki B. and Wüthrich K., *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, 118, 8146-8147.
  21. Kim S. and Szyperski T., *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, 1385-1393.
  22. Kozminski W. and Zhukov I., *J. Biomol. NMR* **2003**, 26, 157-166.
  23. (a) Kupce E. and Freeman R., *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, 13958-13959; (b) Kupce E. and Freeman R., *J. Biomol. NMR* **2003**, 27, 383-387.
  24. Kupce E. and Freeman R., *Conc. Magn. Reson.* **2004**, 22A, 4-11.
  25. (a) Kupce E. and Freeman R., *J. Biomol. NMR* **2004**, 28, 391-395; (b) Kupce E. and Freeman R., *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126, 6429-6440; (c) Coggins B. E., Venters R. A. and Zhou P., *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126, 1000-1001.
  26. Coggins B. E., Venters R. A. and Zhou P., 45<sup>th</sup> ENC, **2004**, Assilomar (Pacific Grove).
  27. (a) Kupce E. and Freeman R., *J. Magn. Reson.* **2003**, 162, 158-165; (b) Kupce E. and Freeman R., *J. Magn. Reson.* **2003**, 162, 300-310; (c) Kupce E., Nishida T. and Freeman R., *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* **2003**, 42, 95-122.
  28. Hadamard J., *Bull. Sci. Math.* **1983**, 17, 240-248.
  29. Brutscher B., *J. Biomol. NMR* **2004**, 29, 57-64.
  30. (a) Frydman L., Scherf T. and Lupulescu A., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2002**, 99, 15858-15862; (b) Frydman L., Lupulescu A. and Scherf T., *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, 9204-9217; (c) Shrot Y. and Frydman L., *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, 11385-11396.
  31. Stehling M. K., Turner R. and P. M., *Science* **1991**, 254, 43-50.
  32. (a) Farrar C. T., Hall D. A., Gerfen G. J., Inati S. J. and Griffin R. G., *J. Chem. Phys.* **2001**, 114, 4922-4933; (b) Ardenkjaer-Larsen J. H., Fridlund B., Gram A., Hansson G., Hansson L., Lerche M. H., Servin R., Thaning M. and Golman K., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2003**, 100, 10158-10163; (c) Shapira B., Morris E., Muszkat K. A. and Frydman L., *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126, 11756 -11757.

- 
33. (a) Brutscher B., *J. Magn. Reson.* **2002**, 156, 155-159; (b) Permi P., *J. Biomol. NMR* **2002**, 23, 201-209; (c) Nietlispach D., Ito Y. and Laue E. D., *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 124, 11199-11207.
  34. Bersch B., Rossy E., Coves J. and Brutscher B., *J. Biomol. NMR* **2003**, 27, 57-67.
  35. (a) Schulte-Herbruggen T., Madi Z. L., Sorensen O. W. and Ernst R. R., *Mol. Phys.* **1991**, 72, 847-871; (b) Palmer A. G., Cavanagh J., Wright P. and Rance M., *J. Magn. Reson.* **1991**, 93, 151-170.
  36. Grzesiek S. and Bax A., *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, 115, 12593-12594.
  37. Brutscher B., *J. Biomol. NMR* **2004**, 29, 57-64.
  38. Kupce E. and Freeman R., *J. Magn. Reson.* **1993**, 105A, 234-238.
  39. Gardner K. H. and Kay L. E., *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **1998**, 27, 357-406.
  40. Nietlispach D., *J. Biomol. NMR* **2004**, 28, 131-136.
  41. (a) Delaglio F., Kontaxis G. and Bax A., *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, 122, 2142-2143; (b) Hus J. C., Marion D. and Blackledge M., *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, 123, 1541-1542; (c) Mal T. K., Matthews S. J., Kovacs H., Campbell I. D. and Boyd J., *J. Biomol. NMR* **1998**, 12, 259-276; (d) Venters R. A., Metzler W. J., Spicer L. D., Mueller L. and Farmer B. T., *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, 117, 9592-9593; (e) Koharudin L. M. I., Bonvin A., Kaptein R. and Boelens R., *J. Magn. Reson.* **2003**, 163, 228-235;
  42. (a) Grzesiek S. and Bax A., *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, 114, 6291-6293; (b) Grzesiek S. and Bax A., *J. Biomol. NMR* **1993**, 3, 185-204.
  43. (a) Montelione G. T., Lyons B. A., Emerson S. D. and Tashiro M., *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, 114, 10974-10975.; (b) Grzesiek S., Anglister J. and Bax A., *J. Magn. Reson. B* **1993**, 101, 114-119.
  44. Brutscher B., *J. Magn. Reson.* **2004**, 167, 178-184.
  45. Bendall M. R., Doddrell D. M. and Pegg D. T., *J. Chem. Phys.* **1982**, 77, 2745-2752.
  46. Wishart D. S. and Sykes B. D., *J. Biomol. NMR* **1994**, 4, 171-180.
  47. Linge J. P., Habeck M., Rieping W. and Nilges M., *Bioinformatics* **2003**, 19, 315-316.
  48. Clore G. M., Kay L. E., Bax A. and Gronenborn A. M., *Biochemistry* **1991**, 30, 12-18; (b) Zwahlen C., Gardner K. H., Sarma S. P., Horita D. A., Byrd R. A. and Kay L. E., *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, 120, 7617-7625.
  49. Bax A., Mehlkopf A. F. and Smidth J., *J. Magn. Reson.* **1979**, 35, 167-169.
  50. Van Melckebeke H., Simorre J. P. and Brutscher B., *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126, 9584-9591.
  51. Kupce E. and Freeman R., *J. Magn. Reson.* **1996**, 118A, 299-303.
  52. Van Melckebeke H., Simorre J. P. and Brutscher B., *J. Magn. Reson.* **2004**, 170, 199-205.
  53. Millet O., Muhandiram D. R., Skrynnikov N. R. and Kay L. E., *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 124, 6439-6448.
  54. Hajduk P. J., Augeri D. J., Mack J., Mendoza R., Yang J. G., Betz S. F. and Fesik S. W., *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, 122, 7898-7904.

- 
55. (a) Tjandra N. and Bax A., *J. Magn. Reson.* **1997**, 124, 512-515; (b) Sibille N., Bersch B., Coves J., Blackledge M. and Brutscher B., *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 124, 14616-14625; (c) Pervushin K. and Vogeli B., *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, 9566-9567.
56. Rossy E., Champier L., Bersch B., Brutscher B., Blackledge M. and Coves J., *J. Biol. Inorg. Chem.* **2004**, 9, 49-58.
57. Prestegard J. H. and Kishore A. I., *Current Opinion in Chemical Biology* **2001**, 5, 584-590.
58. (a) Prestegard J. H., Al-Hashimi H. M. and Tolman J. R., *Q. Rev. Biophys.* **2000**, 33, 371-424; (b) Bax A., Kontaxis G. and Tjandra N., *Methods Enzymol.* **2001**, 339, 127-74.
59. Brutscher B., *J. Magn. Reson.* **2001**, 151, 332-338.
60. Rückert M. and Otting G., *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, 122, 7793-7797.
61. Chenavas S., Simorre J.-P., Dubosclard V., Pebay-Peyroula E., Gans P., Brutscher B., and Fieschi F., manuscrit en préparation.
62. Champier L., Sibille N., Bersch B., Brutscher B., Blackledge M. and Coves J., *Biochemistry* **2002**, 41, 3770-3780.
63. Barkay T., Miller S. M. and Summers A. O., *FEMS Microbiol. Rev.* **2003**, 27, 355-384.
64. Schiering N., Kabsch W., Moore M. J., Distefano M. D., Walsh C. T. and Pai E. F., *Nature* **1991**, 352, 168-72.
65. Arnesano F., Banci L., Bertini I., Ciofi-Baffoni S., Molteni E., Huffman D. L. and O'Halloran T. V., *Genome Res.* **2002**, 12, 255-271.
66. Morelle N., Brutscher B., Simorre J. P. and Marion D., *J. Biomol. NMR* **1995**, 5, 154-160.
67. (a) Richarz R. and Wüthrich K., *Biopolymers* **1978**, 17, 2133-2141; (b) Wishart D. S., Sykes B. D. and Richards F. M., *J Mol Biol.* **1991**, 222, 311-333.
68. Hus J. C., Marion D. and Blackledge M., *J. Mol. Biol.* **2000**, 298, 927-936.
69. (a) Ottiger M., Delaglio F. and Bax A., *J. Magn. Reson.* **1998**, 131, 373-378; (b) Ottiger M., Delaglio F., Marquardt J. L., Tjandra N. and Bax A., *J. Magn. Reson.* **1998**, 134, 365-369; (c) Carlomagno T., Peti W. and Griesinger C., *J Biomol NMR.* **2000**, 17, 99-109.
70. (a) Tugarinov V., Hwang P. M. and Kay L. E., *Annu. Rev. Biochem.* **2004**, 73, 107-146; (b) Tugarinov V., Muhandiram R., Ayed A. and Kay L. E., *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 124, 10025-10035; (c) Fiaux J., Bertelsen E. B., Horwich A. L. and Wüthrich K., *Nature* **2002**, 418, 207-211.
71. (a) Guilhaudis L., Simorre J. P., Blackledge M., Neuburger M., Bourguignon J., Douce R., Marion D. and Gans P., *Biochemistry* **1999**, 38, 8334-8346; (b) Guilhaudis L., Simorre J. P., Blackledge M., Marion D., Gans P., Neuburger M. and Douce R., *Biochemistry* **2000**, 39, 4259-4266.
72. Tugarinov V., Hwang P. M., Ollerenshaw J. E. and Kay L. E., *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, 10420-10428.
73. Boisbouvier J., Delaglio F. and Bax A., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2003**, 100, 11333-11338.



- 
74. Boisbouvier J., Gans P., Blackledge M., Brutscher B. and Marion D., *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, 121, 7700-7701.
  75. Ikegami T., Verdier L., Sakhaii P., Grimme S., Pescatore B., Saxena K., Fiebig K. M. and Griesinger C., *J. Biomol. NMR* **2004**, 29, 339-349.
  76. Wohnert J., Franz K. J., Nitz M., Imperiali B. and Schwalbe H., *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, 13338-13339.
  77. Castellani F., van Rossum B., Diehl A., Schubert M., Rehbein K. and Oschkinat H., *Nature* **2002**, 420, 98-102.
  78. Duma L., Hediger S., Brutscher B., Bockmann A. and Emsley L., *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, 11816-11817.