

J. 2006/05

UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNOLOGIES DE LILLE

THESE

Présentée pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNOLOGIES DE LILLE

Mention Chimie Organique et Macromoléculaire

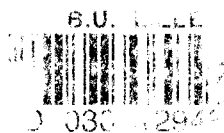
par

Christophe DHALLUIN



ETUDE PAR RESONANCE MAGNETIQUE NUCLEAIRE A L'ANGLE MAGIQUE DE MOLECULES SUR SUPPORT SOLIDE

Soutenue le 17 décembre 1997 devant la commission d'examen



Professeur André TARTAR
Professeur Jean JEENER
Professeur Gaston VERMEERSCH
Professeur Jean-Paul AMOUREUX
Docteur Martial PIOTTO
Docteur Guy LIPPENS

Président
Rapporteur
Rapporteur
Examineur
Examineur
Directeur de thèse

Remerciements

Ce travail a été réalisé dans le laboratoire de Résonance Magnétique Nucléaire du Service de Chimie des Biomolécules à l'Institut Pasteur de Lille, avec le soutien financier de la Région Nord-Pas de Calais et de la société BRUKER Spectrospin.

Je tiens à remercier le Professeur André Tartar pour m'avoir accueilli dans son laboratoire, et pour me faire l'honneur de présider mon jury de thèse.

Ma rencontre avec le Professeur Jean Jeener pendant mon service militaire à Paris a été déterminante pour ma venue à Lille. Je tiens à l'en remercier ainsi que pour son soutien dans la recherche de mon stage post-doctoral et pour sa présence dans mon jury de thèse en tant que rapporteur.

Je tiens à remercier le Professeur Gaston Vermeersch, qui suit mon parcours avec attention depuis le stage que j'ai pu réaliser dans son laboratoire pendant ma maîtrise, pour avoir accepté d'examiner mon travail en tant que rapporteur.

Je remercie également le Professeur Jean-Paul Amoureux et le Docteur Martial Piotto pour leur participation à mon jury.

Je voudrais remercier tout particulièrement Guy Lippens, qui m'a suivi et conseillé pendant ces trois années de thèse, pour la confiance qu'il m'a accordée, la possibilité qu'il m'a donnée de découvrir la RMN des protéines mais surtout des molécules sur support solide à partir de la RMN à l'angle magique.

Je tiens à adresser toute ma reconnaissance et toute ma sympathie à l'équipe RMN et Modélisation qui m'a soutenu pendant ces trois années: Jean-Michel, Gérard, Eric, Dragos, Benoît et Seetha.

Je souhaite également remercier Iuliana Pop, Nathalie Mokrzycki et Christophe Boutillon, chimistes et biochimistes avec qui j'ai eu le plaisir de collaborer.

Un grand merci à tous ceux au labo qui ont participé de près ou de loin, par leurs conseils ou leur amitié, à mon travail.

Je finirai par remercier ceux qui me sont proches et qui ont toujours été présents auprès de moi pour me soutenir pendant ces trois années: Céline, mes chers parents, mes frères et soeurs et leurs enfants, mes beaux-parents, ma belle famille et mes amis.

Sommaire

Sommaire

Remerciements	1
Sommaire	3
Liste des acides aminés	9
Introduction générale	10
CHAPITRE I: La RMN MAS et la synthèse en phase solide	13
A. La synthèse en phase solide et les techniques d'analyse	13
1. Structure générale des composés en phase solide	13
2. Les techniques analytiques pour la synthèse en phase solide	16
2.1 Les méthodes destructrices	16
2.2 Les méthodes non destructrices	17
2.3 Une méthode non destructrice de choix: La RMN MAS	18
B. La technique RMN MAS pour l'analyse directe de composés en phase solide	19
1. Principe général	19
2. L'échantillon: la molécule attachée à son support solide	21
2.1 La résine sèche	21
2.2 La résine gonflée	21
3. Principe de la technique RMN à l'angle magique	22
3.1 Les interactions en RMN	22
3.1.1 L'interaction avec le champ magnétique externe: l'interaction Zeeman	22
3.1.2 L'interaction électron-noyau: le déplacement chimique	23
3.1.3 L'interaction dipôle-dipôle	23
3.1.4 La susceptibilité magnétique	24

3.2 L'interaction dipolaire	25
3.2.1 Définition	25
3.2.2 Intensité de l'interaction dipolaire	28
3.2.3 Description du Hamiltonien d'interaction dipolaire	29
3.2.4 Calcul du spectre théorique pour deux spins 1/2 identiques	33
3.2.4.1 Les états énergétiques	33
3.2.4.2 Le spectre théorique	35
3.2.5 Calcul du spectre théorique ¹ H d'une poudre: le gypse	37
3.3 La technique de rotation de l'échantillon à l'angle magique	39
3.3.1 Origine	39
3.3.2 Définition	39
3.3.3 Description de la rotation à l'angle magique	39
3.3.4 La rotation à l'angle magique en RMN du solide - parallèle avec l'échange chimique en RMN du liquide	40
3.3.5 Description du Hamiltonien d'interaction dipolaire sous la rotation à l'angle magique	42
3.4 L'Anisotropie de déplacement chimique	45
3.4.1 Définition	45
3.4.2 Le Hamiltonien d'anisotropie de déplacement chimique	46
3.5 Les discontinuités de susceptibilité magnétique dans les composés sur support solide	47
3.5.1 Les discontinuités internes de susceptibilité magnétique	47
3.5.1.1 Origine	48
3.5.1.2 Les composés sur support solide	48
3.5.2 Les discontinuités externes de susceptibilité magnétique	51
3.6 La technique RMN MAS des composés en phase solide	52
3.6.1 Le gonflement de la résine et la rotation à l'angle magique	52
3.6.2 La rotation à l'angle magique et les mouvements moléculaires	53
3.7 Tableau récapitulatif des élargissements en RMN MAS des composés en phase solide	54
3.8 Aspects expérimentaux et pratiques	55
3.8.1 Le gonflement de la résine	55
3.8.2 L'analyse	55
3.8.3 Considérations pratiques	56

C. La technique RMN MAS appliquée à la synthèse en phase solide	58
1. Suivi complet d'une synthèse organique en phase solide: la réaction de Heck	58
1.1 Introduction	58
1.2 Suivi complet d'une synthèse organique en phase solide incluant la réaction de Heck	58
1.3 Conclusion et perspectives	59
2. Suivi complet de la synthèse peptidique en phase solide d'une "séquence difficile"	60
2.1. Introduction	60
2.2 Suivi complet de la synthèse peptidique en phase solide d'une "séquence difficile"	61
2.3 Etudes complémentaires	62
2.3.1 Un déplacement chimique inhabituel en ^1H	62
2.3.2 Un déplacement chimique inhabituel en ^{13}C	64
2.3.3 Origine des déplacements chimiques du proton $\text{H}\alpha$ et du carbonyle du dernier résidu couplé	65
2.3.4 Hypothèse conformationnelle pour le résidu en position N-terminale du peptide sur la résine	67
2.4 Conclusion	69
2.5 Perspectives	69
D. Références	71
E. Annexes	75
Annexe I.1 Calcul des états énergétiques de deux spins 1/2 identiques en interaction dipolaire	75
A I.1.1 Les fonctions d'états d'un spin nucléaire I	75
A I.1.2 Les fonctions d'états pour deux spins 1/2 identiques	76
A I.1.3 Les états énergétiques de deux spins 1/2 identiques en interaction dipolaire	78
Annexe I.2 L'interaction dipolaire: une interaction tensorielle dipôle-dipôle	81
A I.2.1 Définition	81
A I.2.2 Expression du Hamiltonien d'interaction dipolaire dans le référentiel du laboratoire	84

A I.2.3 Expression du Hamiltonien d'interaction dipolaire sous la rotation à l'angle magique	87
Annexe I.3 Tables	91
A.I.3.1 Les opérateurs tensoriels irréductibles T_{Lm}	91
A.I.3.2 Les matrices de rotation de Wigner	91
Annexe I.4 L'interaction d'anisotropie de déplacement chimique: une interaction tensorielle électron-noyau	92
Annexe I.5 Tables des déplacements chimiques ^1H et ^{13}C des échantillons de peptidyl-résines durant la synthèse de la "séquence difficile"	94
 CHAPITRE II: La minimisation de la saturation de l'eau	 98
 A. Introduction	 98
1. Le signal de l'eau: un problème en RMN biologique	98
2. Les méthodes de suppression du signal de l'eau	99
3. Les impulsions sélectives sur l'eau: les impulsions <i>water flip-back</i>	100
 B. Les séquences WATERGATE NOESY et WATERGATE TOCSY avec incorporation d'impulsions <i>water flip-back</i>	 101
1. La méthode de suppression du signal de l'eau WATERGATE	101
2. L'amortissement par rayonnement cohérent ou <i>radiation damping</i>	103
2.1 Définition	103
2.2 Les méthodes pour supprimer les effets du <i>radiation damping</i>	105
3. La séquence <i>water flip-back</i> WATERGATE NOESY	107
3.1 Utilisation d'une impulsion <i>water flip-back</i> dans l'expérience Homonucléaire NOESY	107
3.2 Les trajectoires de l'aimantation de l'eau	108
4. La séquence <i>water flip-back</i> WATERGATE TOCSY	109
4.1 Minimisation de l'état de saturation de l'eau dans l'expérience homnucléaire TOCSY	109
4.2 Les trajectoires de l'aimantation de l'eau	110

C. Conclusion	112
D. Références	113
CHAPITRE III: La détermination de la structure tridimensionnelle d'une toxine d'araignée	115
A. Introduction	115
B. Matériels et méthodes	117
1. Préparation de l'échantillon pour l'analyse RMN	117
2. Acquisition des données RMN	118
3. Génération des structures	119
3.1 Contraintes sur les distances	119
3.2 Contraintes sur les angles dièdres	119
3.3 Calcul de structures	120
4. Détermination des ponts disulfures	121
C. Résultats	123
1. L'attribution	123
1.1 L'attribution séquentielle	123
1.2 L'attribution des carbones	123
2. Détermination de la structure secondaire	124
3. Détermination des ponts disulfures par RMN	126
3.1 Calcul des poids statistiques W_{ij}	126
3.2 Calcul des poids statistiques W_p	128
4. Détermination de la structure tridimensionnelle	130
5. Description de la structure tridimensionnelle	133
D. Discussion	136
E. Conclusion	138

F. Références	139
G. Annexes	141
Table III.2 Tableau des déplacements chimiques des ^1H et ^{13}C à 30°C de la toxine d'araignée V50F17 (pH = 2.9)	141
Annexe III.1 Génération de structures moléculaires par le programme X-PLOR	143
A.III.1.1 Génération d'une structure arbitraire	143
A.III.1.2 La procédure <i>Distance Geometry</i>	143
A.III.1.3 La procédure de <i>Distance Geometry</i> combinée avec une dynamique moléculaire	144
3.1 La dynamique moléculaire	144
3.2 Le recuit simulé et l'affinement	147
Annexe III.2 Les 28 ponts disulfures potentiels de la toxine d'araignée V50F17	148
Annexe III.3 Les 105 combinaisons potentielles de ponts disulfures de la toxine d'araignée V50F17	149
Conclusion générale	153

Liste des acides aminés

Alanine	Ala	A
Arginine	Arg	R
Asparagine	Asn	N
Acide Aspartique	Asp	D
Cystéine	Cys	C
Glutamine	Gln	Q
Acide Glutamique	Glu	E
Glycine	Gly	G
Histidine	His	H
Isoleucine	Ile	I
Leucine	Leu	L
Lysine	Lys	K
Méthionine	Met	M
Phénylalanine	Phe	F
Proline	Pro	P
Sérine	Ser	S
Thréonine	Thr	T
Tryptophane	Trt	W
Tyrosine	Tyr	Y
Valine	Val	V

Introduction générale

Introduction générale

Deux stratégies sont actuellement connues pour l'élaboration de molécules synthétiques: la synthèse en phase homogène et la synthèse en phase solide. La synthèse en phase solide, beaucoup plus récente que la synthèse en phase homogène, a connu un essor très important depuis sa découverte en 1963 par Merrifield (Merrifield, 1963). C'est notamment la facilité à séparer la molécule synthétisée des excès de solvants, de réactifs et d'impuretés qui fait que cette technique appliquée à l'origine pour la synthèse de peptides, a été développée pour la synthèse de molécules organiques. Cependant, l'un des problèmes majeurs pour le développement de nouvelles synthèses en phase solide est le manque de techniques analytiques rapides et non destructrices permettant la caractérisation des composés lorsqu'ils sont encore ancrés au support solide de synthèse. Récemment, une technique d'analyse par RMN a été développée pour l'analyse directe des composés sur support solide. Cette méthode est basée sur l'utilisation de la technique de la rotation de l'échantillon à l'angle magique (*Magic Angle Spinning, MAS*), qui est une technique empruntée à la RMN du solide (Andrew *et al.*, 1959; Lowe, 1959), combinée avec le gonflement de la matrice solide à l'aide d'un solvant organique approprié. Cette méthode d'analyse est une méthode sensible, directe, rapide et non destructrice qui ne nécessite aucune modification, ni marquage particulier de la molécule à caractériser. Une étude détaillée de la technique RMN *MAS* pour la synthèse en phase solide est présentée dans le chapitre I. Nous nous intéresserons à la fois aux aspects théoriques et expérimentaux de cette méthode. Cette dernière sera appliquée d'une part pour le suivi complet d'une réaction organique, où pour chacune des étapes de la synthèse l'identification complète de chaque entité moléculaire nouvellement formée sur la résine sera obtenue. D'autre part, l'utilisation de la technique RMN *MAS* permettra dans le domaine de la synthèse peptidique d'identifier et d'étudier les origines structurales des problèmes rencontrés lors de la synthèse d'une séquence dite "séquence difficile".

Dans le chapitre I, nous nous sommes intéressés au développement de la technique RMN *MAS* pour l'amélioration des conditions de synthèse dans le domaine de la chimie des peptides. Après coupure de la résine, le peptide mis en solution peut être caractérisé par RMN liquide haute

résolution. Beaucoup de macromolécules biologiques étudiées jusqu'à présent par RMN sont obtenues par synthèse en phase solide. De nos jours, ces études ont pour but de déterminer le plus précisément possible la structure tridimensionnelle de ces macromolécules. Les structures de protéines de masse moléculaire 10-15 kDa peuvent être obtenues en ^1H . L'enrichissement en ^{13}C et en ^{15}N a porté la barre à 20 kDa pour la détermination de la structure tridimensionnelle, et à 30 kDa pour la détermination de la structure secondaire. Pour de telles molécules, de nouvelles séquences impulsives ont été développées, elles sont multidimensionnelles (2D, 3D et 4D) et de plus en plus complexes. Cependant, l'attribution des signaux protons suivie par la détermination de la structure tridimensionnelle reposent sur deux expériences de base: les expériences TOCSY (Braunschweiler & Ernst, 1985) et NOESY (Jeener *et al.*, 1979). En solution aqueuse, nous sommes confrontés au problème de la suppression du signal du solvant. Ce problème est résolu depuis longtemps par la technique de présaturation et plus récemment par l'utilisation de gradients de champ. Néanmoins, l'inconvénient majeur de ces techniques est de générer un état saturé de l'aimantation de l'eau à la fin de chaque expérience, ce qui a pour conséquence de réduire l'intensité des signaux des protons de la macromolécule échangeant rapidement avec les protons de l'eau. Dans le chapitre II, nous présenterons en détail comment, par l'incorporation d'impulsions sélectives sur l'eau (impulsions *water flip-back*), nous avons obtenu une minimisation de l'état de saturation de l'eau dans les expériences NOESY et TOCSY.

Les séquences d'impulsions NOESY et TOCSY que nous avons développées ont été avantageusement utilisées pour l'attribution des résonances d'une toxine, V50F17, isolée du venin de l'araignée *Segestria Florentina*. Jusqu'à présent, aucune structure tridimensionnelle de toxine de venin de cette espèce d'araignée n'était connue. A partir des données obtenues par RMN homonucléaire et hétéronucléaire en abondance naturelle en ^{13}C , nous avons pu déterminer la structure tridimensionnelle de la toxine V50F17 dont l'étude est présentée dans le chapitre III. Cette toxine a été synthétisée par voie chimique au laboratoire et des tests d'activité ont montré que cette toxine inhibait spécifiquement les canaux calciques de type N. Par comparaison avec les structures tridimensionnelles de toxines isolées du venin d'autres espèces d'araignée, V50F17 présente une

conformation originale en raison de la présence d'un domaine structuré en hélice α jamais jusqu'à présent observé chez les toxines de venin d'araignée.

Références

Andrew, E. R.; Bradbury, A.; Eades R. G. *Nature* **1959**, *183*, 1802-1803.

Braunschweiler, L.; Ernst, R. R. *J. Magn. Reson.* **1983**, *53*, 521-528.

Jeener, J.; Meier, B. H.; Bachmann, P.; Ernst, R. R. *J. Chem. Phys.* **1979**, *71*, 4546-4553.

Lowe, I. J. *Phys. Rev. Lett.* **1959**, *2*, 285-287.

Merrifield, R. B. *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, *85*, 2149-2154.

CHAPITRE I

La RMN *MAS* et la synthèse en phase solide

A. La synthèse en phase solide et les techniques d'analyse

1. Structure générale des composés en phase solide

Toutes les molécules synthétisées en phase solide présentent une structure commune constituée de quatre domaines. Le premier domaine est le support solide de synthèse (domaine (a), Figure I.1). Ce support insoluble est en général une résine, c'est à dire une matrice réticulée et constituée de polystyrène et de divinylbenzène comme dans les résines de Merrifield, Wang et TentaGel. Cette matrice est assimilée à des billes. Sur chacune d'entre elles sont attachés des bras moléculaires (domaine (b), Figure I.1) qui vont séparer les molécules synthétisées de la matrice solide de synthèse. Le bras moléculaire est chimiquement inerte et de longueur variable. Il est de courte longueur dans le cas des résines de Merrifield et de Wang, nettement plus long lorsqu'il s'agit de la résine TentaGel où le bras est du polyéthylène glycol (PEG): le PEG est un polymère linéaire de plusieurs centaines d'atomes. La longueur du bras sera un facteur déterminant pour la mobilité de la chaîne moléculaire qui est synthétisée, et parfois pour les propriétés de gonflement de l'ensemble. A l'extrémité du bras, nous trouvons le groupe fonctionnel qui va servir d'ancrage (domaine (c), Figure I.1) entre le bras et la molécule à synthétiser. En fin de synthèse, la coupure de la molécule synthétisée de son support solide se fera au niveau de l'ancrage. Le dernier domaine est celui constitué par la molécule qui est synthétisée (domaine (d), Figure I.1). Est illustrée ci-dessous une Fmoc -(Lysine)- Boc sur une résine de Wang (Figure I.1).

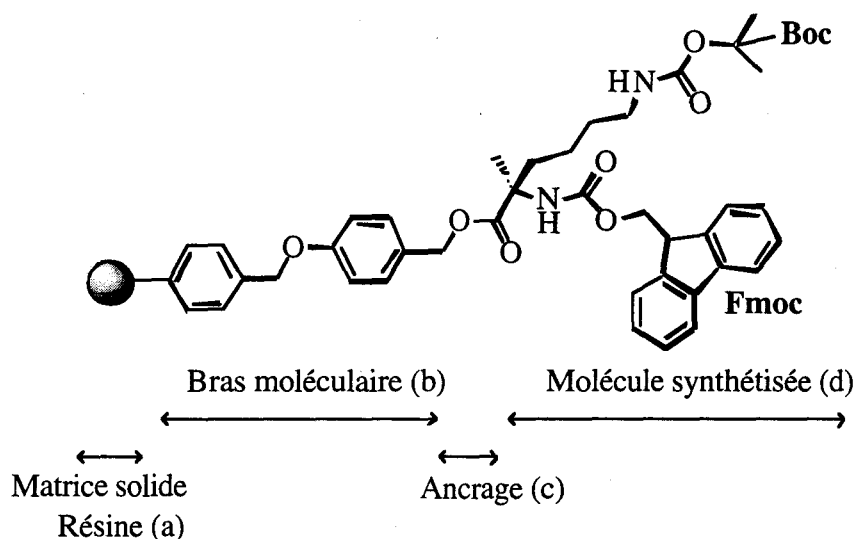
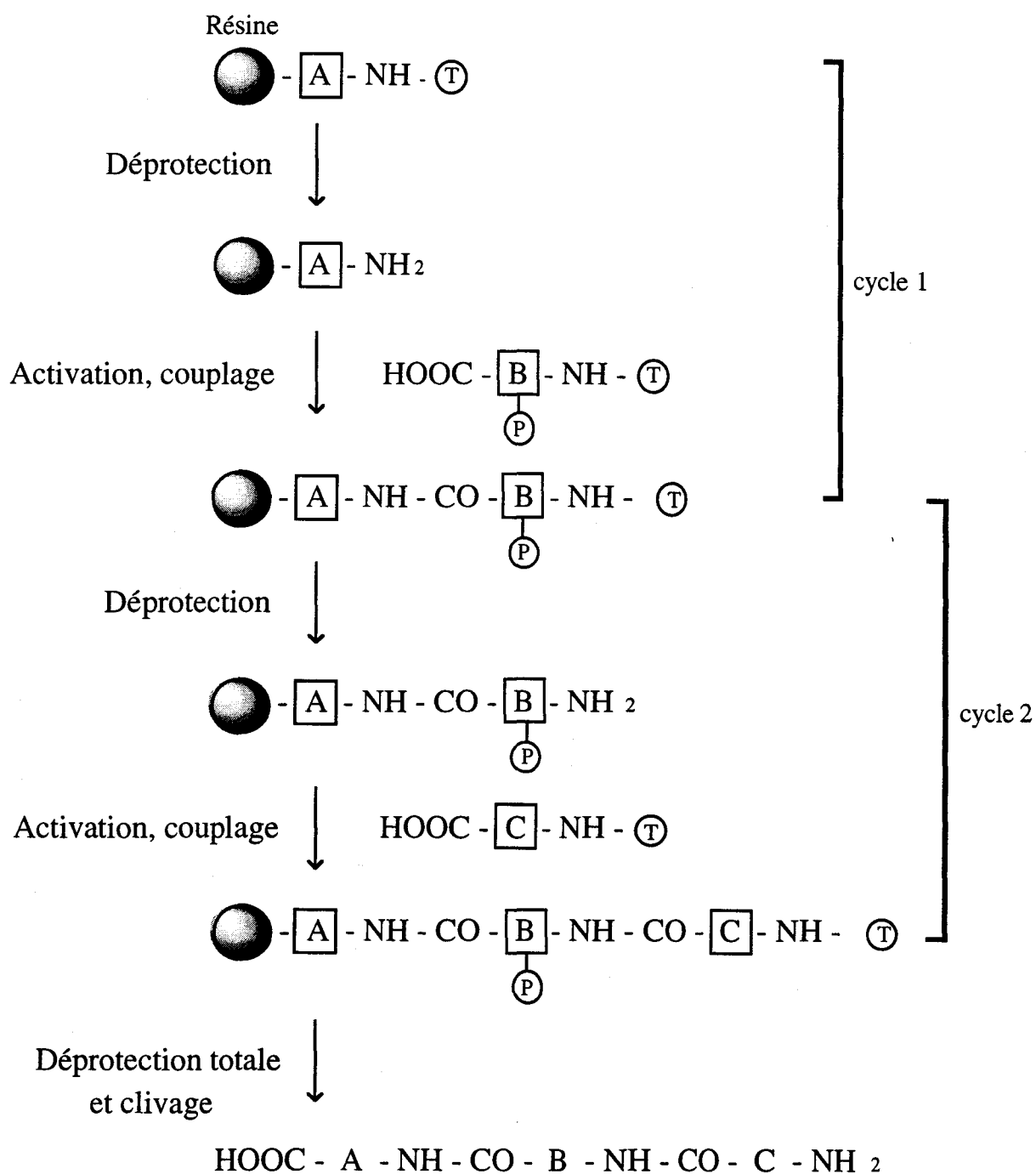


Figure I.1

Pour le composé pris en exemple et qui sera utilisé en synthèse organique (voir § C.1), les groupements Fmoc (fluorenylmethyloxycarbonyle) et Boc (tertio-butyloxycarbonyle) correspondent à des groupements protecteurs dits respectivement "temporaire" et "permanent" : protection temporaire car elle sera coupée en cours de synthèse pour permettre la réaction entre la fonction déprotégée et un nouveau groupement réactif; protection permanente car elle empêchera la fonction protégée de participer aux réactions durant toute la synthèse.

Dans le cas de la synthèse peptidique (voir § C.2), deux grandes stratégies de protection sont généralement utilisées. Il est important pour permettre la seule formation de lien amide entre le NH d'un résidu fixé sur la résine et le groupement carbonyle du résidu que nous désirons coupler, d'une part de protéger le NH de ce résidu par une protection temporaire, mais également de protéger les fonctions réactives des chaînes latérales par des fonctions permanentes pour éviter des réactions secondaires. Les protections permanentes, contrairement aux fonctions temporaires, ne seront coupées qu'en fin de synthèse. Si nous choisissons la stratégie Fmoc, la protection temporaire Fmoc sera coupée par la pipéridine, et les protections permanentes, nécessairement résistantes à la pipéridine, seront coupées en fin de synthèse par l'acide trifluoroacétique (TFA). Si nous choisissons la stratégie Boc, la protection temporaire Boc sera coupée par le TFA, et les protections permanentes, nécessairement résistantes au TFA, seront coupées en fin de synthèse par l'acide fluorhydrique (HF). Le principe général de la synthèse peptidique en phase solide est présentée de façon schématique sur la figure I.2



A, B et C sont rapportés à des acides aminés

T et P sont rapportés aux groupes protecteurs temporaires et permanents respectivement

Figure I.2

2. Les techniques analytiques pour la synthèse en phase solide

2.1 Les méthodes destructrices

L'un des problèmes majeurs au développement de la synthèse en phase solide est le manque de techniques analytiques rapides (si possible non destructrices) pour la caractérisation des composés synthétisés et encore ancrés au support solide de synthèse. Jusqu'à il y a peu de temps, la méthode classiquement employée par les chimistes consistait à cliver la molécule synthétisée de son support solide, éventuellement à la purifier et ensuite à la caractériser par les techniques d'analyse classiques telles que la spectrométrie de masse ou la RMN liquide haute résolution. Cette procédure est relativement longue, de plus il peut y avoir introduction de produit d'artéfacts suite aux réactions de clivage et de déprotection. Le produit synthétisé peut de plus ne pas être soluble après coupure de la résine. Cette procédure est très efficace mais a le sérieux désavantage d'être destructrice.

Néanmoins lorsque le composé synthétisé est encore attaché à la résine, certaines méthodes de contrôle peuvent être employées. Il existe notamment en synthèse peptidique, des tests colorimétriques qui permettent d'évaluer le succès ou l'échec des étapes de déprotection et de couplage en mesurant le taux de groupements amines libres qui ont été déprotégés ou qui n'ont pas réagi (Sarin *et al.*, 1981; Arad & Houghten, 1990).

La méthode de spectrométrie de masse MALDI-TOF (Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time Of Flight) est une méthode d'analyse très sensible et très fine pour l'analyse des composés sur résine (Egner *et al.*, 1995). Cette méthode consiste à séparer à l'aide d'un rayonnement laser la molécule synthétisée de la bille. Après libération au sein du spectromètre de la molécule de son ancrage photosensible, elle est analysée classiquement par spectrométrie de masse. Cette méthode est destructrice, mais ne nécessite que très peu de matériel (quelques billes suffisent). La limite de la méthode réside dans la nécessité d'incorporer un ancrage photosensible et parfois un groupement ionisable par la technique MALDI.

2.2 Les méthodes non destructrices

Récemment des méthodes d'analyse non destructrices, directement sur résine, ont été développées. Ces techniques ne sont pas utilisées de manière courante car elles nécessitent souvent l'incorporation d'un "marqueur" dans la molécule synthétisée pour augmenter la sensibilité et/ou la résolution de la technique d'analyse.

Avec la technique infrarouge à transformée de Fourier (IR-FT) le taux de déprotection peut être évalué directement sur la résine, mais il est nécessaire que les groupes protecteurs portent du deutérium pour rendre la technique résolutive (Larsen *et al.*, 1993; Russell *et al.*, 1996).

Avec la résonance paramagnétique électronique (RPE), une agrégation de la chaîne moléculaire sur la résine peut être identifiée (Cilli *et al.* 1997). Ce type d'information est très important notamment en synthèse peptidique, car l'agrégation sur résine des chaînes polypeptidiques est souvent à l'origine de chute brutale de rendement lors de l'élongation de la chaîne peptidique. Mais une limite importante à l'utilisation de cette technique réside dans l'incorporation nécessaire d'un acide aminé paramagnétique dans la séquence.

Une autre technique non destructrice employée en vue d'une analyse structurale du composé encore attaché à la résine est la RMN du ^{13}C . Cette technique est élégante car elle ne nécessite aucune modification de l'échantillon, ni de conditions préparatoires particulières pour l'analyse, hormis la nécessité fort peu contraignante de gonfler la matrice solide de synthèse à l'aide d'un solvant organique (Giralt *et al.*, 1984; Look *et al.*, 1994). Cette méthode d'analyse, contrairement à l'IR-FT et à la RPE, peut être utilisée de manière courante. La limite de cette technique est sa sensibilité. En effet le faible rapport gyromagnétique du ^{13}C , sa faible abondance naturelle (1.11 %) et la charge relativement réduite en matériel ancré sur la résine nécessitent des temps d'acquisition extrêmement longs, rendant très difficile le suivi complet de réaction en phase solide. D'autres noyaux plus sensibles tels que le ^{19}F (Svensson *et al.*, 1996) et le ^{31}P (Johnson & Zhang, 1995) ont aussi été observés en utilisant la même procédure pour le suivi d'étapes particulières de synthèse.

La limite de la méthode est l'impossibilité d'observer l'un des noyaux les plus abondants dans les composés synthétisés: le ^1H .

2.3 Une méthode non destructrice de choix: La RMN MAS

Récemment une technique s'est révélée être la méthode de choix pour l'analyse directe de composés synthétisés en phase solide: il s'agit de la RMN MAS. Cette méthode est basée sur l'utilisation de la technique de rotation de l'échantillon à l'angle magique (*MAS, Magic Angle Spinning*), qui est une technique de base empruntée à la RMN du solide (Andrew *et al.*, 1959; Lowe, 1959), combinée avec le gonflement de la matrice solide de synthèse par un solvant organique approprié. Cette méthode d'analyse est une méthode directe, sensible, rapide et non destructrice qui ne nécessite aucune modification, ni incorporation de "marqueur" particulier sur la molécule pour sa caractérisation. La rotation (plusieurs kHz) à l'angle magique de l'échantillon de résine gonflée permet l'observation directe des noyaux ^1H et ^{13}C en abondance naturelle avec une résolution proche de celle de la RMN liquide haute résolution (Fitch *et al.*, 1994; Anderson *et al.*, (a), (b), 1995; Pop *et al.*, 1996; Garigipati *et al.*, 1996; Maas *et al.* 1996; Keifer *et al.*, 1996; Jelinek *et al.*, 1997).

B. La technique RMN MAS pour l'analyse directe de composés en phase solide

Nous allons nous intéresser en détail à la technique RMN MAS appliquée à la synthèse en phase solide.

Nous allons tout d'abord présenter les principes généraux de la technique. Nous nous intéresserons en détail à l'échantillon, lorsque la résine portant la molécule synthétisée est sèche, puis gonflée par un solvant. Nous identifierons les différentes contributions responsables de l'élargissement des signaux RMN lors de l'étude de ce type de composé.

Nous présenterons ensuite une description détaillée de la technique RMN MAS pour la synthèse en phase solide.

Nous décrirons les aspects expérimentaux et pratiques de la technique liés à la préparation de l'échantillon et à l'analyse RMN.

Enfin nous terminerons par l'application de la technique RMN MAS pour le suivi complet en phase solide d'une synthèse organique, et d'une synthèse peptidique.

1. Principe général

La technique RMN MAS appliquée à la synthèse en phase solide repose sur la combinaison de deux conditions:

- (i) les billes (domaine (a), Figure I.1) constituant le support solide de synthèse, à défaut d'être dissoutes, doivent être gonflées à l'aide d'un solvant organique approprié; (ii) l'analyse RMN doit être réalisée en utilisant la technique de rotation de l'échantillon à l'angle magique (MAS).

Tandis que l'addition d'un solvant à la résine (domaine (a), Figure I.1) mène à une solvation efficace des molécules synthétisées (domaine (d), Figure I.1) et leur confère ainsi une mobilité augmentée, la rotation rapide de l'échantillon à l'angle magique va efficacement moyenniser les différences de susceptibilité magnétique sur la totalité de l'échantillon hétérogène, ce qui permet d'avoir accès à des spectres résolus en ^1H et en ^{13}C pour la molécule ancrée à la résine. La très bonne résolution des données RMN obtenues avec cette technique fait qu'elle est aussi appelée technique RMN Haute Résolution *MAS* (HR-*MAS*).

En combinant le gonflement de la résine et le *MAS*, le comportement des molécules ancrées tend à se rapprocher des composés classiques rencontrés en RMN liquide haute résolution. Toutes les séquences impulsionnelles utilisées sont celles empruntées à la RMN du liquide, qui utilisent les transferts via les couplages scalaires homonucléaires et hétéronucléaires ainsi que l'effet dipolaire de type NOE.

Grâce à la technique RMN *MAS* nous avons directement accès à l'identification complète des molécules encore attachées au support solide de synthèse. Cette méthode analytique permet de faire le suivi complet d'une réaction en phase solide, où pour chacune des étapes un simple prélèvement de quelques milligrammes de résine permet de déterminer le succès ou l'échec de la synthèse. Il est aussi possible d'identifier les problèmes structuraux à l'origine des étapes difficiles dans la synthèse qui nécessitent des couplages et des déprotections répétés. Enfin une analyse conformationnelle approfondie de la molécule sur support solide, basée sur l'analyse des contacts NOE (Wüthrich, 1986) et sur la déviation des déplacements chimiques du ^1H et du ^{13}C (Wishart *et al.*, 1992, 1995; Wishart & Sykes, 1994) peut aussi être réalisée par cette méthode. Ce dernier cas concerne surtout la synthèse peptidique en phase solide, et peut présenter un avantage considérable par rapport à la RMN liquide, pour l'étude de peptides qui ont tendance à s'agréger en solution.

2. L'échantillon: la molécule attachée à son support solide

2.1 La résine sèche

L'attribution des ^1H et des ^{13}C de la molécule attachée à son support solide de synthèse, lorsque la résine est sèche, est impossible en raison de l'élargissement important des raies de résonance: les spectres consistent en des enveloppes très larges et non résolues. Ces élargissements sont dus aux interactions classiques rencontrées en RMN du solide: l'anisotropie de déplacement chimique (CSA), et les interactions de type dipôle-dipôle. Pour un échantillon de résine sèche, ces interactions produisent des signaux ^1H complètement inexploitable dont la largeur de raie peut atteindre 10 kHz (Figure I.3 (A)).

Il faut également considérer les effets d'élargissement et de perturbation des raies de résonance dus à la présence de fortes inhomogénéités de susceptibilité magnétique à l'intérieur de l'échantillon. Ces variations de susceptibilité magnétique proviennent de la nature hétérogène de l'échantillon (Figure I.1), mais aussi des différences de susceptibilité magnétique des matériaux constituant la sonde de mesure RMN (les bobines, le stator qui va accueillir le rotor).

2.2 La résine gonflée

Après l'addition d'un solvant organique à la matrice solide, un gradient de mobilité se développe, où des mouvements lents se développeront au niveau de la matrice solide gonflée (domaine (a) Figure I.1) et des mouvements plus rapides au niveau des molécules à analyser (domaine (d) Figure I.1). Les interactions de CSA et dipolaire ^1H - ^1H (interaction dipolaire dominante) qui existaient lorsque la matrice solide était sèche, sont fortement moyennées à zéro en raison de la liberté de mouvement des molécules ancrées qui conduisent à des mouvements de réorientation rapides et aléatoires des chaînes. La largeur de raie du spectre en ^1H devient alors inférieure à 1 kHz (≈ 0.6 kHz) mais le spectre reste cependant complètement inexploitable (Figure I.3 (C)).

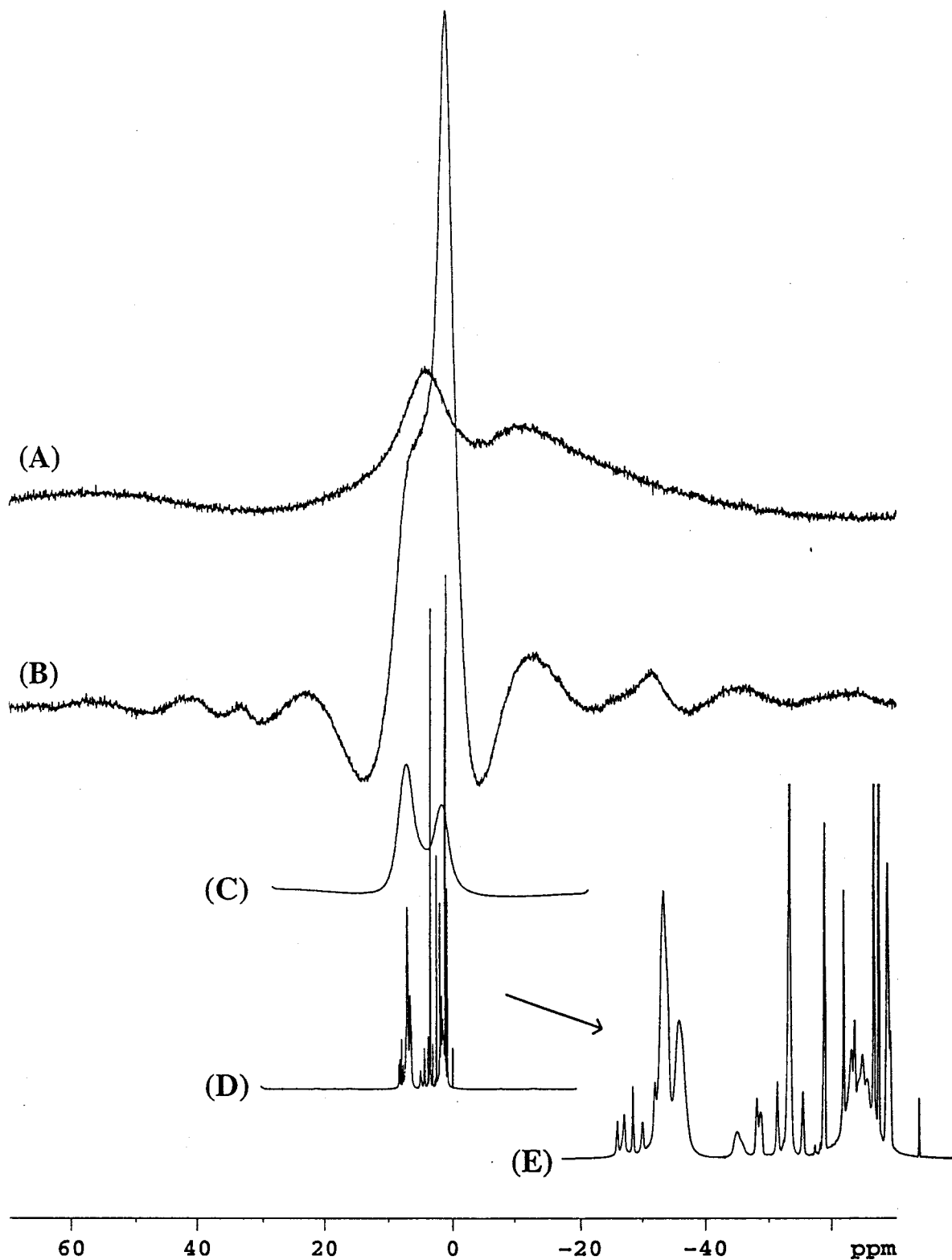


Figure I.3: Spectres 1D ^1H de la peptidyl-résine (Résine Wang)-Ile-Val-Ser(OtBu)-Gly-Arg(Pmc)-Ala-NH₂: (A) spectre statique de la peptidyl-résine sèche, (B) spectre sous MAS ($\omega_r = 5$ kHz) de la peptidyl-résine sèche, (C) spectre statique de la peptidyl-résine gonflée dans le DMF-*d*₇, (D) et (E) spectres sous MAS ($\omega_r = 4$ kHz) de la peptidyl-résine gonflée dans le DMF-*d*₇.

Quant aux discontinuités de susceptibilité magnétique, elles deviennent plus importantes, avec l'addition de solvant, en raison du caractère très hétérogène de l'échantillon qui présente de nombreuses interfaces (solvant / billes gonflées). Lorsque la résine est gonflée, l'échantillon n'est plus un solide: il présente des domaines ne contenant que du solvant, des domaines non solubles de mobilité réduite (domaine (a) Figure I.1), et des domaines intermédiaires de mobilité importante (domaines (b), (c), et (d) Figure I.1). Tous ces domaines vont définir, à l'intérieur de l'échantillon, des susceptibilités magnétiques différentes qui seront responsables en partie de la largeur de raie résiduelle encore importante (Figure I.3 (C)).

3. Principe de la technique RMN à l'angle magique

3.1 Les interactions en RMN

3.1.1 L'interaction avec le champ magnétique externe: l'interaction Zeeman

Les noyaux qui possèdent un spin ont un moment magnétique nucléaire qui leur est associé. C'est l'interaction entre ces moments magnétiques nucléaires et le champ magnétique externe \mathbf{B}_0 qui est à la base de toute expérience en RMN. Cette interaction, connue sous le nom d'interaction Zeeman, est toujours l'interaction la plus importante pour les spins 1/2 (^1H , ^{13}C , ^{15}N ...).

Du point de vue classique, l'énergie d'interaction d'un moment magnétique \mathbf{m} avec le champ magnétique externe \mathbf{B}_0 est $E = -\mathbf{m} \cdot \mathbf{B}_0$. En mécanique quantique, l'interaction d'un moment magnétique nucléaire \mathbf{m}_j (avec $\mathbf{m}_j = \gamma_j \hbar \mathbf{I}_j$ où γ_j représente le rapport gyromagnétique du noyau j , et où $\hbar = h/2\pi$ avec h la constante de Planck) avec le champ externe \mathbf{B}_0 s'exprime par le Hamiltonien d'interaction Zeeman:

$$\mathcal{H}_{\text{Zeeman}} = - \gamma_j \hbar \mathbf{I}_j \cdot \mathbf{B}_0$$

En plus du champ magnétique externe appliqué, les noyaux vont aussi ressentir de nombreux champs magnétiques internes d'intensité nettement plus faible que \mathbf{B}_0 .

3.1.2 L'interaction électron-noyau: le déplacement chimique

Sous l'effet du champ magnétique externe \mathbf{B}_0 , il y a une polarisation des électrons des noyaux, et précession de Larmor des électrons périphériques autour des noyaux. La déformation des orbitales électroniques d'un noyau due aux électrons des noyaux voisins va se traduire par l'apparition de champs magnétiques internes, qui vont s'ajouter vectoriellement à \mathbf{B}_0 , et qui vont modifier le champ ressenti par ce noyau: c'est le phénomène d'écrantage ou de déplacement chimique.

Dans un échantillon solide, cas d'une poudre par exemple, toutes les orientations spatiales sont possibles et équiprobables pour un noyau. Pour chacune de ces orientations statiques, le noyau pourra avoir un environnement différent. Un déplacement chimique sera observé pour le noyau pour chacune des orientations que celui-ci aura dans l'espace: c'est l'anisotropie de déplacement chimique ou CSA. L'interaction de CSA est responsable d'un élargissement important des raies de résonance en RMN du solide.

Dans un échantillon liquide, du fait du caractère isotrope et rapide des mouvements, le déplacement chimique sera moyenné à une valeur unique pour chaque noyau: c'est le déplacement chimique isotrope.

3.1.3 L'interaction dipôle-dipôle

Une autre source de champs magnétiques internes est issue de la polarisation nucléaire. Les moments magnétiques nucléaires vont s'orienter de manière parallèle ou antiparallèle par rapport à la direction du champ magnétique externe \mathbf{B}_0 . Chaque moment magnétique nucléaire \mathbf{m} va créer dans l'espace un champ magnétique interne qui va perturber le champ ressenti par tous les noyaux voisins: c'est l'interaction dipôle-dipôle ou interaction dipolaire. L'amplitude de l'interaction

dipolaire entre deux moments magnétiques dépend de l'inverse de la distance au cube entre les deux moments magnétiques, et de l'orientation du vecteur internucléaire \mathbf{r} par rapport au champ externe \mathbf{B}_0 .

Dans un échantillon liquide, l'interaction dipolaire sera moyennée à zéro du fait des mouvements rapides et aléatoires des molécules. Elle ne contribuera que par son caractère fluctuant à la largeur de ligne, via la relaxation T_2 .

Dans un échantillon solide, cas d'une poudre par exemple, les mouvements moléculaires sont nettement plus réduits et toutes les orientations des vecteurs internucléaires \mathbf{r} sont possibles et équiprobables. Un élargissement très important des raies de résonance sera observé.

3.1.4 La susceptibilité magnétique

Une autre source de perturbation du champ magnétique ressenti par les noyaux est issue de l'échantillon lui-même lorsqu'il est placé dans le champ magnétique externe \mathbf{B}_0 . Cette contribution est fonction de la nature de l'échantillon, et plus précisément de la façon dont celui-ci va "réagir" dans le champ \mathbf{B}_0 : nous parlons alors de sa susceptibilité magnétique. En effet, le caractère inhomogène de la susceptibilité magnétique à l'intérieur de l'échantillon est une source de perturbation importante sur le champ ressenti par les noyaux.

Dans le cas des composés sur support solide (Figure I.1), lorsque la résine est sèche, l'échantillon est purement solide, il en a les caractéristiques et propriétés. Lorsque la résine est gonflée, l'échantillon ressemble à un gel, à mi-chemin entre les états solide et liquide. Il présente des domaines de compositions différentes qui seront caractérisés par une mobilité distincte ainsi que par une susceptibilité magnétique individuelle. Les domaines fortement solvatés (domaines (b), (c) et (d) Figure I.1) contiennent des molécules mobiles, et seront caractérisés par une susceptibilité magnétique proche de celle du solvant. En revanche la matrice solide (domaine (a) Figure I.1) qui, elle, sera moins mobile contribuera à une autre susceptibilité magnétique. Ces susceptibilités

magnétiques sont fonction de la composition de chaque domaine, de leur volume et géométrie, et de leur orientation relative par rapport au champ magnétique externe \mathbf{B}_0 .

Toutes ces discontinuités, accompagnées de celles issues des composants de la sonde de mesure RMN, auront pour effet d'affecter les fréquences de résonances des noyaux, causant une distribution de déplacements chimiques qui apparaît comme une augmentation de la largeur des raies de résonance.

3.2 L'interaction dipolaire

3.2.1 Définition

Un noyau avec un moment angulaire de spin $\hbar \mathbf{I}_j$, possède un moment magnétique nucléaire $\mathbf{m}_j = \gamma_j \hbar \mathbf{I}_j$. Ce moment magnétique va créer un champ magnétique local $\mathbf{B}_j(\mathbf{r})$, qui va interagir avec tous les moments magnétiques environnants: c'est l'interaction dipolaire. Le champ $\mathbf{B}_j(\mathbf{r})$ va s'ajouter vectoriellement au champ magnétique externe \mathbf{B}_0 .

L'énergie d'un moment magnétique \mathbf{m}_k situé à une distance r de \mathbf{m}_j est donnée par l'expression classique de l'énergie de \mathbf{m}_k dans le champ dipolaire du à \mathbf{m}_j (Figure I.4):

$$E_{\text{dipolaire}} = - \mathbf{m}_k \cdot \mathbf{B}_j(\mathbf{r})$$

$$\text{avec } \mathbf{B}_j(\mathbf{r}) = \frac{\mu_0}{4\pi} \frac{\{ 3(\mathbf{r} \cdot \mathbf{m}_j) \mathbf{r} - r^2 \mathbf{m}_j \}}{r^5}$$

L'énergie dipolaire devient

$$E_{\text{dipolaire}} = \frac{\mu_0}{4\pi} \frac{\{ r^2(\mathbf{m}_j \cdot \mathbf{m}_k) - 3(\mathbf{r} \cdot \mathbf{m}_j)(\mathbf{r} \cdot \mathbf{m}_k) \}}{r^5}$$

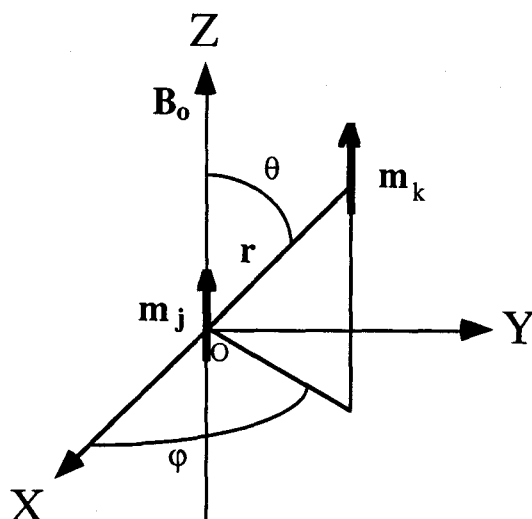


Figure I.4

Dans le champ externe et intense B_0 (selon l'axe (OZ)), les moments magnétiques, tout en subissant les effets de perturbation des champs dipolaires de leurs voisins, gardent une orientation proche de celle de l'axe (OZ): c'est l'effet de perturbation du champ dipolaire sur le champ total ressenti par les noyaux. Sans le champ B_0 , le moment magnétique m_k s'orienterait dans la direction du champ dipolaire $B_j(r)$ créé par m_j (et inversement).

Nous remarquons immédiatement que, lorsque le moment magnétique m_k en un point P de l'espace est perpendiculaire à la direction du champ magnétique $B_j(r)$ créé en P par le moment magnétique m_j , l'énergie d'interaction dipolaire $E_{\text{dipolaire}} = -m_k \cdot B_j(r)$ entre les deux moments magnétiques m_j et m_k est nulle.

Nous avons calculé et représenté dans la figure I.5, quelques lignes de champ de $B_j(r)$. Lorsque le moment magnétique m_k est perpendiculaire au vecteur champ dipolaire porté par la ligne de champ en ce point, l'interaction dipolaire est nulle. Cette condition est réalisée, quand le vecteur internucléaire r fait un angle de $54^\circ 7'$ avec le champ magnétique externe B_0 : c'est la condition de l'angle magique.

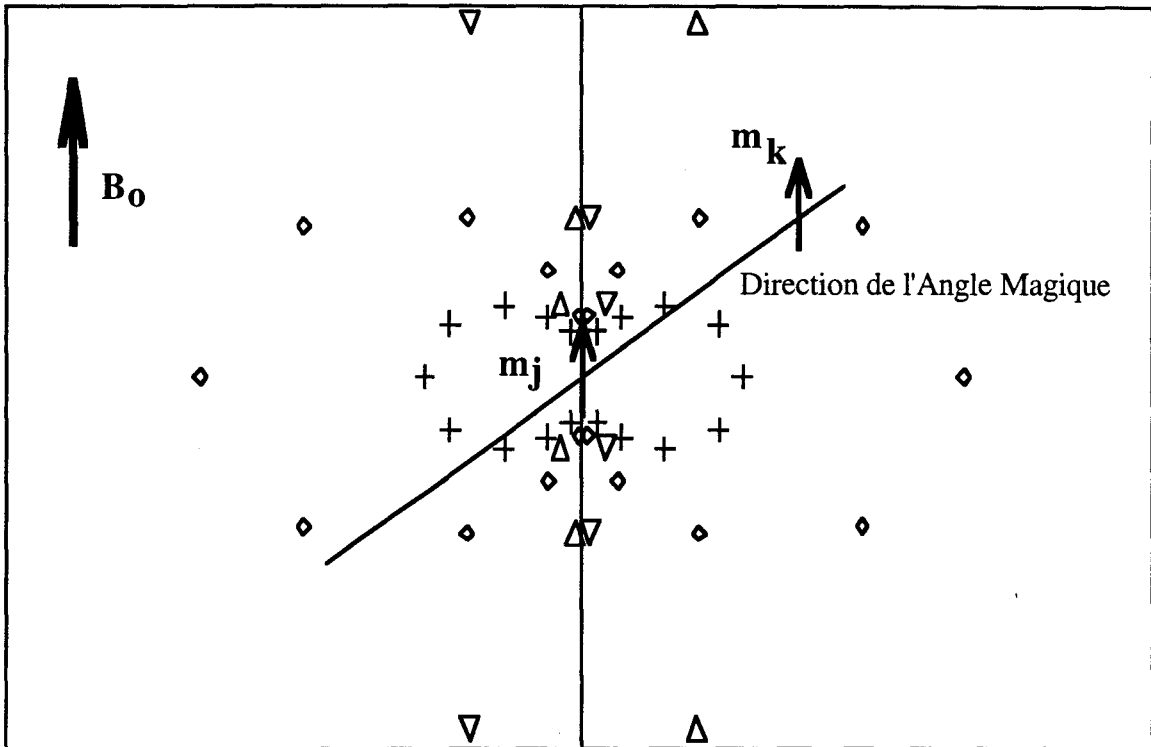


Figure I.5

Lorsque les deux moments magnétiques \mathbf{m}_j et \mathbf{m}_k ont la même orientation par rapport au vecteur \mathbf{r} (Figure I.4), l'énergie dipolaire devient:

$$E_{\text{dipolaire}} = \frac{\mu_0}{4\pi} \frac{(\mathbf{m}_j \cdot \mathbf{m}_k)}{r^3} (1 - 3 \cos^2 \theta)$$

L'interaction dipolaire est de symétrie axiale, et dépend des paramètres (r, θ) qui définissent la longueur et l'orientation du vecteur internucléaire \mathbf{r} par rapport à \mathbf{B}_0 (Figure I.4). Nous retrouvons la condition de l'angle magique, qui annule l'énergie d'interaction dipolaire. En effet la dépendance angulaire $(1 - 3 \cos^2 \theta)$ est nulle lorsque $\theta = \arccos(3^{-1/2}) = 54^\circ$.

3.2.2 Intensité de l'interaction dipolaire

L'intensité de l'interaction dipolaire entre deux noyaux est indépendante du champ magnétique externe \mathbf{B}_0 , et sera un facteur déterminant pour la largeur de raie. Elle peut être facilement calculée en utilisant la définition quantique du moment magnétique $\mathbf{m} = \gamma \hbar \mathbf{I}$, ainsi nous obtenons:

$$\omega_D = \frac{\mu_0}{4\pi} \frac{\gamma_j \gamma_k \hbar}{r^3}$$

où $\mu_0 / 4\pi = 10^{-7} \text{ m.kg.s}^{-2}.\text{A}^2$ et $\hbar = 1.054 \cdot 10^{-34} \text{ rad}^{-1}.\text{kg.s}^{-1}$

L'interaction dipolaire homonucléaire

Dans le cas de deux protons distants dans l'espace de 2.00 Å, l'intensité de l'interaction dipolaire est de l'ordre de 15 kHz:

$$\omega_D (\text{H-H}) = \frac{\mu_0}{4\pi} \frac{\gamma_H^2 \hbar}{r^3}$$

avec $\gamma_{\text{H}} = 2.675 \cdot 10^8 \text{ rad.kg}^{-1}.\text{s.A}$ nous obtenons

$$\omega_D (\text{H-H}) = \frac{(10^{-7} \text{ m.kg.s}^{-2}.\text{A}^2) (2.675 \cdot 10^8 \text{ rad.kg}^{-1}.\text{s.A})^2 (1.054 \cdot 10^{-34} \text{ rad.kg.m}^2.\text{s}^{-1})}{(2.00 \cdot 10^{-10} \text{ m})^3}$$

$$\omega_D (\text{H-H}) = 9.43 \cdot 10^4 \text{ rad.s}^{-1} \approx 15 \text{ kHz}$$

Nous remarquons immédiatement que l'interaction dipolaire $^1\text{H}-^1\text{H}$ peut être très intense (15 kHz), néanmoins elle sera toujours très faible devant l'interaction Zeeman (300 MHz à 6.5 T).

C'est pour cette raison que l'interaction dipolaire est toujours considérée, dans les calculs de mécanique quantique, comme une perturbation devant l'interaction Zeeman.

Dans les solides, l'interaction dipolaire ^1H - ^1H va être responsable de l'élargissement important des raies de résonance. Cet élargissement peut atteindre jusqu'à 120 kHz, et produit des signaux ^1H complètement inexploitable. La gamme de déplacements chimiques en ^1H est très faible (≈ 10 ppm), chaque raie individuelle est très large car l'interaction dipolaire est forte, nous n'observons alors que l'enveloppe des différentes raies individuelles.

L'interaction dipolaire ^{13}C - ^{13}C est négligeable en raison du faible rapport gyromagnétique du ^{13}C et de sa faible abondance naturelle (1.11%).

L'interaction dipolaire hétéronucléaire

Dans le cas d'un proton et d'un carbone distants de 1.00 Å, l'intensité de l'interaction dipolaire est de l'ordre de 30 kHz:

$$\omega_D(\text{C-H}) = \frac{\mu_0}{4\pi} \frac{\gamma_C \gamma_H \hbar}{r^3} \approx 30 \text{ kHz}$$

avec $\gamma_{^{13}\text{C}} = 6.728 \cdot 10^7 \text{ rad.kg}^{-1}.\text{s.A}$

Dans les solides, lorsque le ^{13}C est observé, c'est l'interaction dipolaire ^{13}C - ^1H qui va être l'interaction dipolaire dominante, responsable de l'élargissement important des raies de résonance.

3.2.3 Description du Hamiltonien d'interaction dipolaire

La description quantique de l'interaction dipolaire entre deux moments magnétiques \mathbf{m}_j et \mathbf{m}_k est décrite par le Hamiltonien d'interaction dipolaire $\mathcal{H}_{\text{dipolaire}}$.

Avec $\mathbf{m}_j = \gamma_j \hbar \mathbf{I}_j$ et $\mathbf{m}_k = \gamma_k \hbar \mathbf{I}_k$ nous avons:

$$\mathcal{H}_{\text{dipolaire}} = \frac{\mu_0}{4\pi} \gamma_j \gamma_k \hbar^2 \frac{\{ r^2 (\mathbf{I}_j \cdot \mathbf{I}_k) - 3 (\mathbf{r} \cdot \mathbf{I}_j) (\mathbf{r} \cdot \mathbf{I}_k) \}}{r^5}$$

En effectuant les produits scalaires nous obtenons:

$$\mathbf{I}_j \cdot \mathbf{I}_k = I_{jx} I_{kx} + I_{jy} I_{ky} + I_{jz} I_{kz}$$

$$\mathbf{r} \cdot \mathbf{I}_j = x I_{jx} + y I_{jy} + z I_{jz}$$

$$\mathbf{r} \cdot \mathbf{I}_k = x I_{kx} + y I_{ky} + z I_{kz}$$

Le Hamiltonien peut être développé de la manière suivante en coordonnées cartésiennes:

$$\begin{aligned} \mathcal{H}_{\text{dipolaire}} = \frac{\mu_0}{4\pi} \frac{\gamma_j \gamma_k \hbar^2}{r^3} \{ & I_{jx} I_{kx} (1 - \frac{3x^2}{r^2}) + I_{jy} I_{ky} (1 - \frac{3y^2}{r^2}) + I_{jz} I_{kz} (1 - \frac{3z^2}{r^2}) \\ & - (I_{jx} I_{ky} + I_{jy} I_{kx}) \frac{3xy}{r^2} - (I_{jy} I_{kz} + I_{jz} I_{ky}) \frac{3yz}{r^2} - (I_{jz} I_{kx} + I_{jx} I_{kz}) \frac{3zx}{r^2} \} \end{aligned}$$

Cette expression peut aussi s'écrire sous forme matricielle:

$$\mathcal{H}_{\text{dipolaire}} = \frac{\mu_0}{4\pi} \frac{\gamma_j \gamma_k \hbar^2}{r^3} [I_{jx} I_{jy} I_{jz}] \begin{bmatrix} 1 - \frac{3x^2}{r^2} & -\frac{3xy}{r^2} & -\frac{3zx}{r^2} \\ -\frac{3xy}{r^2} & 1 - \frac{3y^2}{r^2} & -\frac{3yz}{r^2} \\ -\frac{3zx}{r^2} & -\frac{3yz}{r^2} & 1 - \frac{3z^2}{r^2} \end{bmatrix} \begin{bmatrix} I_{kx} \\ I_{ky} \\ I_{kz} \end{bmatrix}$$

ou encore d'une façon plus réduite par:

$$\mathcal{H}_{\text{dipolaire}} = \hbar \omega_D \mathbf{I}_j \cdot \overline{\overline{\mathbf{D}}} \cdot \mathbf{I}_k$$

$$\text{avec } \omega_D = \frac{\mu_0}{4\pi} \frac{\gamma_j \gamma_k \hbar}{r^3}$$

où $\overline{\overline{\mathbf{D}}}$ représente le tenseur d'ordre 2 de l'interaction dipolaire. Nous remarquons immédiatement que le tenseur $\overline{\overline{\mathbf{D}}}$ est de trace nulle et symétrique ($D_{\alpha\beta} = D_{\beta\alpha}$). De plus si le vecteur internucléaire \mathbf{r} est le long de l'axe (OZ), le tenseur $\overline{\overline{\mathbf{D}}}$ devient diagonal. Le système d'axes où le tenseur $\overline{\overline{\mathbf{D}}}$ est diagonal est appelé le référentiel d'axes propres du tenseur. $\overline{\overline{\mathbf{D}}}$ est de symétrie axiale $D_{11} = D_{22} = 1$.

$$\overline{\overline{\mathbf{D}}}$$
 dans son référentiel d'axes propres a pour expression
$$\begin{bmatrix} 1 & 0 & 0 \\ 0 & 1 & 0 \\ 0 & 0 & -2 \end{bmatrix}$$

Il est plus pratique pour déterminer le spectre résultant de deux moments magnétiques en interaction dipolaire, d'exprimer le Hamiltonien dipolaire $\mathcal{H}_{\text{dipolaire}}$ en coordonnées sphériques.

La passage des coordonnées cartésiennes aux coordonnées sphériques s'effectue simplement en posant $x = r \sin \theta \cos \varphi$, $y = r \sin \theta \sin \varphi$, et $z = r \cos \theta$ (Figure I.4). Et en exprimant les opérateurs de spin I_x et I_y en fonction des opérateurs ascendants $I_+ = I_x + i I_y$ et descendants $I_- = I_x - i I_y$ des spins \mathbf{I}_j et \mathbf{I}_k , nous obtenons:

$$\mathcal{H}_{\text{dipolaire}} = \hbar \omega_D (A + B + C + D + E + F)$$

$$\text{avec } \omega_D = \frac{\mu_0}{4\pi} \frac{\gamma_j \gamma_k \hbar}{r^3}$$

$$A = I_{jz} I_{kz} (1 - 3 \cos^2 \theta)$$

$$B = -\frac{1}{4} (I_{j+} I_{k-} + I_{j-} I_{k+}) (1 - 3 \cos^2 \theta)$$

$$C = -\frac{3}{2} (I_{j+} I_{kz} + I_{jz} I_{k+}) \sin \theta \cos \theta e^{-i\varphi}$$

$$D = -\frac{3}{2} (I_{j-} I_{kz} + I_{jz} I_{k-}) \sin \theta \cos \theta e^{i\varphi}$$

$$E = -\frac{3}{4} I_{j+} I_{k+} \sin^2 \theta e^{-2i\varphi}$$

$$F = -\frac{3}{4} I_{j-} I_{k-} \sin^2 \theta e^{+2i\varphi}$$

Chacun des termes A à F contient une partie constituée d'opérateurs de spin et par une partie angulaire dépendant des paramètres (θ, φ) .

Les termes A et B commutent avec le Hamiltonien d'interaction Zeeman $\mathcal{H}_{\text{Zeeman}}$. Ils représentent la partie séculaire du Hamiltonien d'interaction dipolaire. Ils sont responsables de la forme de raie. Ces termes sont utilisés pour le calcul de perturbation au 1^{er} ordre de l'énergie. Nous remarquons immédiatement que les termes A et B sont nuls sous la condition de l'angle magique $\theta = 54.7^\circ$.

Les termes C, D, E et F ne commutent pas avec $\mathcal{H}_{\text{Zeeman}}$. Ils représentent la partie non séculaire du Hamiltonien d'interaction dipolaire. Ils sont liés à la relaxation. Ces termes entrent en compte dans le calcul au second ordre de l'énergie.

Cas d'un liquide

Dans un liquide, par suite des mouvements rapides et isotropes des molécules (mouvement Brownien), les orientations des vecteurs \mathbf{r} sont équiprobables, ce qui conduit à l'élimination de l'interaction dipolaire statique. La dépendance angulaire des termes A et B est moyennée à zéro:

$$\int_0^{2\pi} \int_0^{\pi} (3 \cos^2 \theta - 1) \sin \theta \, d\theta \, d\varphi = 0$$

Cas d'un solide

Dans un solide, toutes les orientations des vecteurs \mathbf{r} sont possibles par rapport à la direction du champ magnétique externe \mathbf{B}_0 . Comme le montre l'expression du Hamiltonien d'interaction dipolaire, chaque orientation du vecteur \mathbf{r} va contribuer au spectre total. Le spectre résultant sera une enveloppe très large contenant l'ensemble des contributions de chaque orientation des vecteurs \mathbf{r} .

3.2.4 Calcul du spectre théorique pour deux spins 1/2 identiques

Plaçons nous dans le cas d'un solide monocristallite où une orientation unique de \mathbf{r} est possible par rapport à \mathbf{B}_0 . Pour calculer le spectre théorique d'une paire de spins 1/2 identiques, en interaction dipolaire dans un champ magnétique externe \mathbf{B}_0 , on ne retiendra que la partie séculaire du Hamiltonien d'interaction dipolaire.

3.2.4.1 Les états énergétiques

Soient $\mathbf{m}_1 = \gamma \hbar \mathbf{I}_1$ et $\mathbf{m}_2 = \gamma \hbar \mathbf{I}_2$ les moments magnétiques associés à deux spins 1/2 identiques ($\gamma_1 = \gamma_2 = \gamma$), \mathbf{I}_1 et \mathbf{I}_2 sans couplage scalaire J direct et ayant le même glissement chimique. Le Hamiltonien total qui va décrire les états énergétiques des deux spins s'exprimera par:

$$\mathcal{H}_{\text{Total}} = \mathcal{H}_{\text{Zeeman}} + \mathcal{H}_{\text{dipolaire}}$$

où le Hamiltonien d'interaction Zeeman décrivant l'interaction des deux moments magnétiques \mathbf{m}_1 et \mathbf{m}_2 avec le champ magnétique externe \mathbf{B}_0 s'exprime par:

$$\mathcal{H}_{\text{Zeeman}} = - \gamma \hbar (\mathbf{I}_1 + \mathbf{I}_2) \cdot \mathbf{B}_0 = - \hbar \omega_0 (I_{1z} + I_{2z})$$

$$\text{avec } \omega_0 = \gamma B_0$$

En ne retenant que la partie séculaire du Hamiltonien d'interaction dipolaire pour les deux spins, nous avons:

$$\mathcal{H}_{\text{dipolaire}} = \hbar \omega_D (A + B)$$

$$\text{avec } \omega_D = \frac{\mu_0 \gamma^2 \hbar}{4\pi r^3}$$

La dépendance des coordonnées spatiales se trouve encore dans les termes A et B. Alternativement, nous pouvons séparer les coordonnées spatiales des opérateurs de spin et écrire:

$$\mathcal{H}_{\text{dipolaire}} = \hbar \omega_D (\theta) \left\{ I_{1jz} I_{2z} - \frac{1}{4} (I_{1+} I_{2-} + I_{1-} I_{2+}) \right\}$$

$$\text{avec } \omega_D (\theta) = \frac{\mu_0 \gamma^2 \hbar}{4\pi r^3} (1 - 3 \cos^2 \theta)$$

Les deux spins $1/2 \mathbf{I}_1$ et \mathbf{I}_2 sont identiques. Plaçons nous dans le cas de l'interaction dipolaire homonucléaire $^1\text{H}-^1\text{H}$. Cette interaction est très intense (elle peut atteindre 50 kHz), cependant elle reste très faible devant l'interaction Zeeman (300 MHz à 6.5 T). C'est pourquoi l'interaction dipolaire est traitée comme une perturbation dans le calcul des états énergétiques des spins \mathbf{I}_1 et \mathbf{I}_2 . Ce calcul a été effectué en utilisant une base couplée représentant les états des deux spins \mathbf{I}_1 et \mathbf{I}_2 en interaction dipolaire dans le champ magnétique externe \mathbf{B}_0 (voir Annexe I.1).

Les états énergétiques des spins de deux protons en interaction dipolaire dans le champ magnétique externe \mathbf{B}_0 peuvent être représentés sous forme d'un diagramme énergétique (Figure I.6).

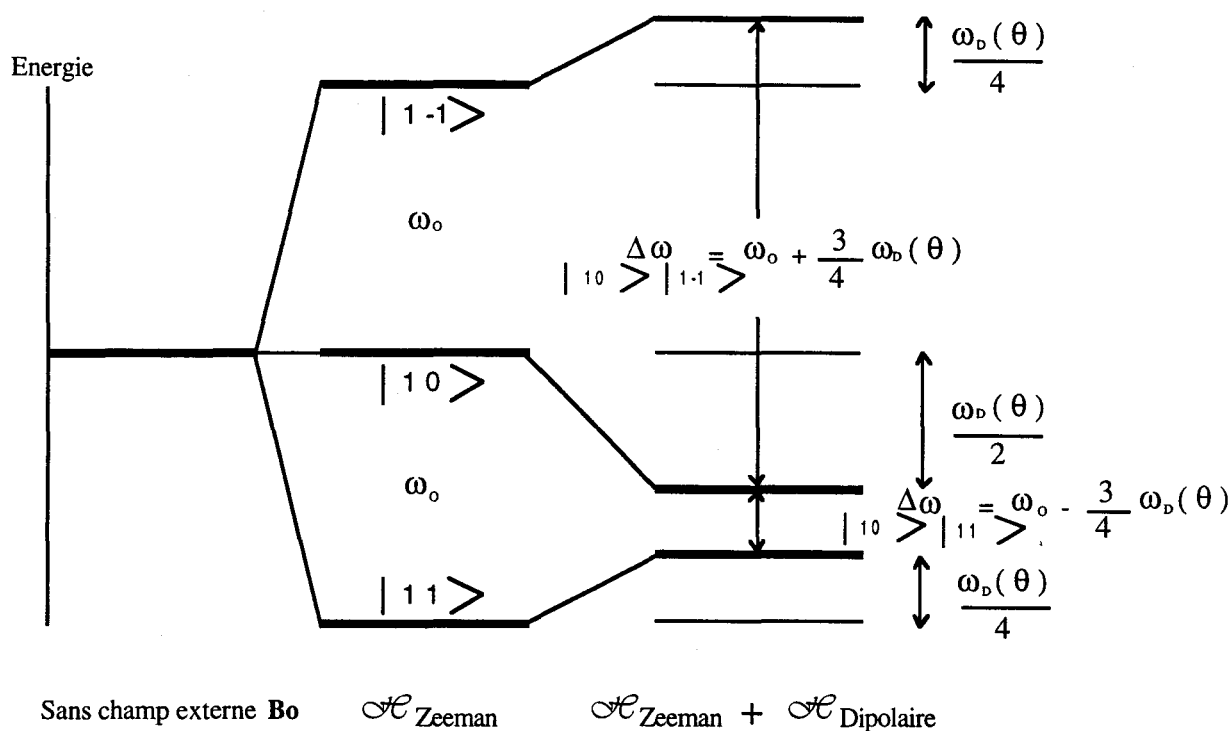


Figure I.6

Le diagramme montre immédiatement que sous l'interaction Zeeman, une seule transition sera observée en ω_0 . En tenant compte de l'interaction dipolaire, un doublet symétrique par rapport à ω_0 est observé: deux transitions sont autorisées, elles correspondent aux écarts énergétiques $[\omega_0 \pm 3/4 \omega_D(\theta)]$.

3.2.4.2 Le spectre théorique

En raison de l'interaction dipolaire, le spectre théorique pour deux protons, dont le vecteur internucléaire \mathbf{r} fait un angle θ avec le champ magnétique externe B_0 , sera un doublet symétrique par rapport à ω_0 . Les deux raies ont leur fréquence de résonance à

$$\omega_o \pm \frac{3}{4} \frac{\mu_0}{4\pi} \frac{\gamma^2 \hbar}{r^3} (1 - 3 \cos^2 \theta).$$

Cette relation montre que l'écartement entre les raies est périodique de période π , qu'il est fonction de l'orientation du vecteur internucléaire r entre les deux protons par rapport à la direction du champ B_o , et de la distance entre ces deux protons (Figure I.4).

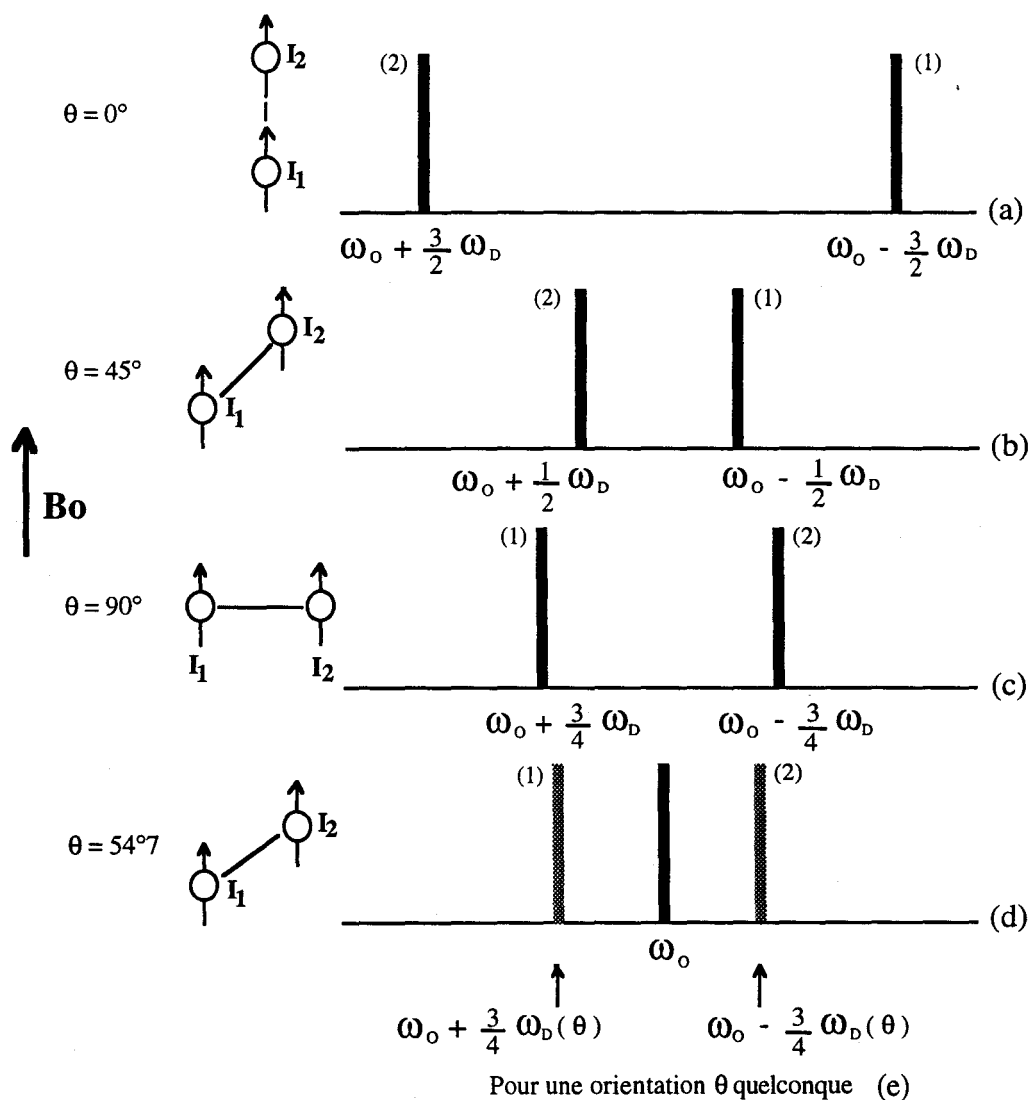


Figure I.7

Le spectre théorique est schématiquement représenté sur la Figure I.7 pour $\theta = 0^\circ$ (a), pour $\theta = 45^\circ$ (b), pour $\theta = 90^\circ$ (c), et pour une orientation θ quelconque du vecteur \mathbf{r} par rapport à \mathbf{B}_0 (e). Quand $\theta = 54.7^\circ$, le spectre se réduit à une raie unique centrée en ω_0 (d): l'élargissement dipolaire est alors nul.

L'écartement maximal $\omega_D(\theta)$ des deux raies correspond aux positions du vecteur \mathbf{r} où $\theta = k\pi$ et $\theta = \pi/2 + k\pi$ (Figure I.7). Ainsi l'une des raies se trouvera dans le domaine des fréquences $\Delta\omega$ tel que:

$$\omega_0 - \frac{3}{4} \omega_D \leq \Delta\omega \leq \omega_0 + \frac{3}{2} \omega_D$$

La seconde raie se trouvera dans le domaine de fréquence $\Delta\omega'$ tel que:

$$\omega_0 - \frac{3}{2} \omega_D \leq \Delta\omega' \leq \omega_0 + \frac{3}{4} \omega_D$$

Dans le cas d'un échantillon de poudre, toutes les orientations du vecteur \mathbf{r} par rapport à \mathbf{B}_0 sont possibles et équiprobables. Les domaines de fréquences autorisées pour les deux transitions montrent que la largeur totale du spectre sera de $3 \omega_D$. Chaque orientation du vecteur \mathbf{r} va contribuer au spectre final qui sera une enveloppe large ($3 \omega_D$) contenant l'ensemble des paquets de doublets correspondant à chaque orientation du vecteur \mathbf{r} par rapport à \mathbf{B}_0 .

3.2.5 Calcul du spectre théorique ^1H d'une poudre: le gypse

Le gypse ($\text{SO}_4\text{Ca}, 2 \text{H}_2\text{O}$) contient deux molécules d'eau rigidement liées au réseau cristallin. Il constitue un bon modèle pour représenter un ensemble de paires de spins $1/2$ isolées en

interaction dipolaire (Pake, 1948). Faisons abstraction de la dynamique moléculaire de ces molécules d'eau, en se plaçant à très basse température. Toutes les orientations des vecteurs internucléaires \mathbf{r} reliant deux protons d'une molécule d'eau ($d = 1.58 \text{ \AA}$) sont possibles et équiprobables.

Le calcul de la forme théorique du spectre peut se réduire à la construction d'un histogramme, où pour chaque valeur de θ nous attribuons deux transitions à $\omega_0 \pm 3/4 \omega_D(\theta)$ et un nombre de molécules d'eau où le vecteur \mathbf{r} fait un angle θ avec l'axe (Oz). En utilisant les coordonnées sphériques, cette dernière probabilité est donnée par:

$$\frac{1}{4\pi} \int_0^{2\pi} d\varphi \sin \theta = \frac{1}{2} \sin \theta$$

Nous pouvons ainsi construire cet histogramme (Figure I. 8), et nous confirmons bien que les deux transitions sont limitées aux domaines de fréquences $\{\omega_0 - 3/4 \omega_D \leq \Delta\omega \leq \omega_0 + 3/2 \omega_D\}$ et $\{\omega_0 - 3/2 \omega_D \leq \Delta\omega' \leq \omega_0 + 3/4 \omega_D\}$ respectivement.

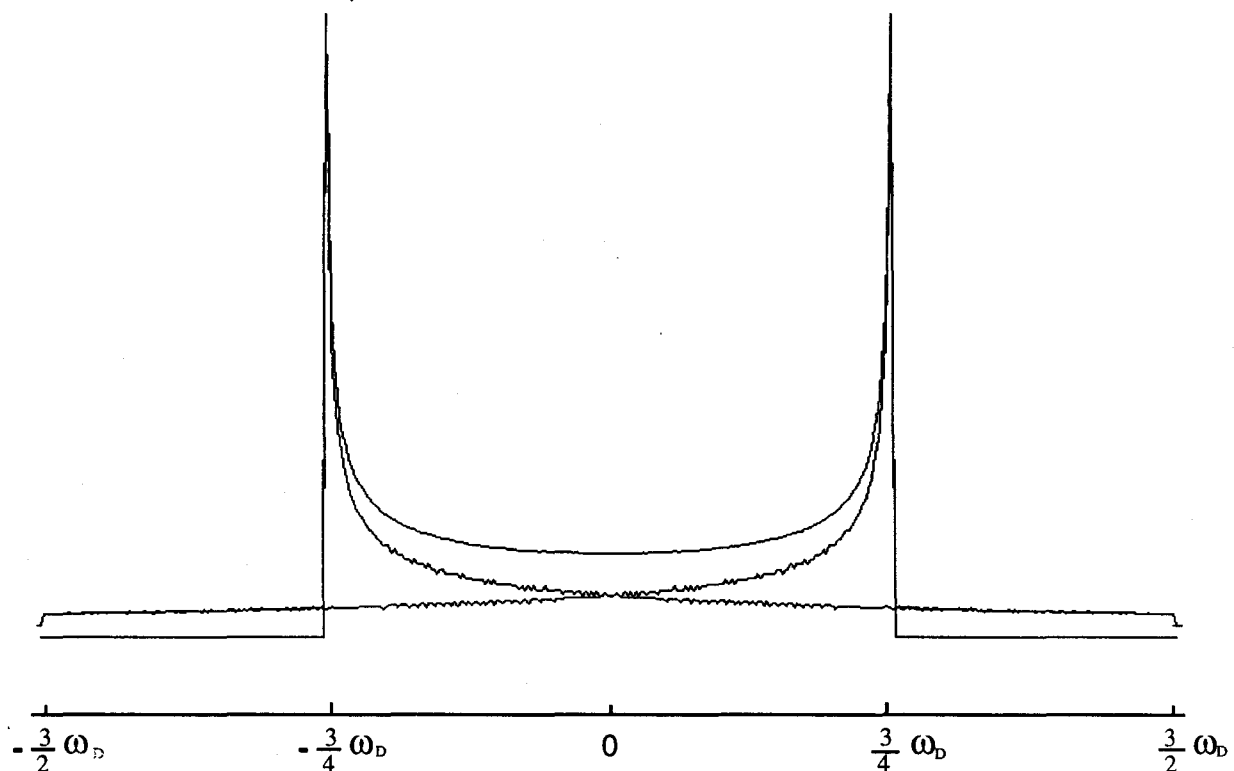


Figure I.8

Toutes les orientations possibles et équiprobables des vecteurs \mathbf{r} contribuent au spectre final de largeur totale $3 \omega_D$ (Figure I.8), où chaque raie d'un doublet est autorisée à se trouver dans un domaine de fréquence donnée $\Delta\omega$ et $\Delta\omega'$.

3.3 La technique de rotation de l'échantillon à l'angle magique

3.3.1 Origine

Trouver l'équivalent, pour un solide, des mouvements moléculaires observés dans les liquides, qui moyenneraient à zéro les interactions statiques de type anisotropie de déplacement chimique (CSA) et de couplage dipôle-dipôle, a été à l'origine de la méthode de rotation à haute vitesse de l'échantillon à l'angle magique (MAS) découverte par Andrew et Lowe (Andrew *et al*, 1959; Lowe, 1959).

3.3.2 Définition

La technique de rotation de l'échantillon à l'angle magique consiste à effectuer dans le référentiel du laboratoire des rotations rapides à la vitesse ω_r (plusieurs kHz) de l'échantillon autour de la direction de l'angle magique. La direction de l'angle magique fait un angle de $54^\circ 7'$ par rapport à la direction du champ magnétique externe \mathbf{B}_0 (Figure I.9 (a)).

3.3.3 Description de la rotation à l'angle magique

La rotation rapide du rotor à l'angle magique (Figure I.9 (a)), va entraîner tous les vecteurs internucléaires \mathbf{r}_{jk} à effectuer un mouvement de rotation autour de la direction de l'angle magique (Figure I.9 (b)). Pour chacun des vecteurs \mathbf{r}_{jk} , c'est à dire pour chaque paire de dipôles, le mouvement de rotation fait comme si les deux dipôles se voient en moyenne sur l'axe de rotation, et

si cet axe est choisi le long de la direction de l'angle magique, l'interaction dipôle-dipôle va se trouver moyennée à zéro paire par paire.

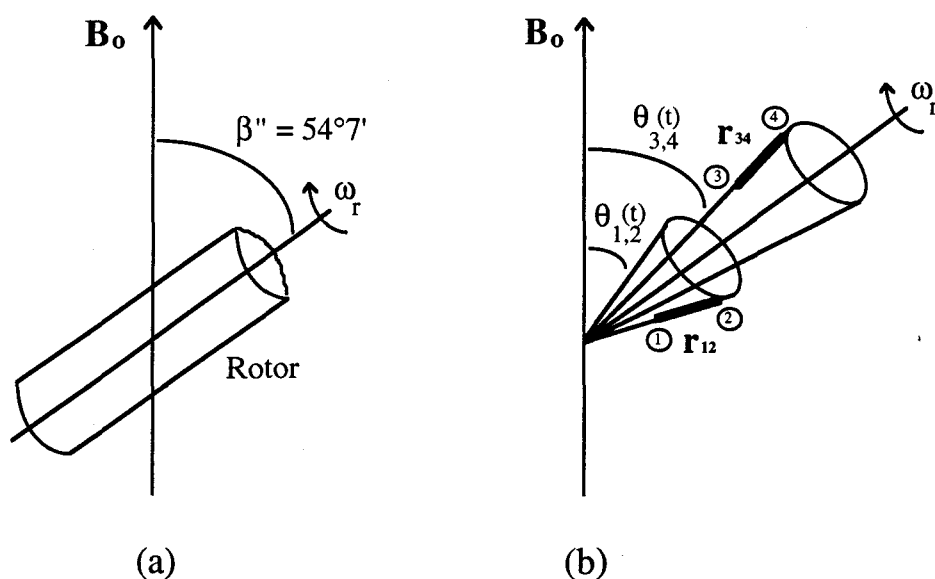


Figure I.9

3.3.4 La rotation à l'angle magique en RMN du solide - parallèle avec l'échange chimique en RMN du liquide

Cas d'un liquide

Lorsqu'un noyau peut occuper deux environnements dans une molécule en solution, deux situations peuvent se présenter. La première est celle où le noyau échange lentement entre ces deux positions. Un déplacement chimique est observé pour ce noyau dans les deux environnements, soient deux déplacements chimiques séparés par $\Delta\nu$. Le nombre de fois où le noyau va échanger par seconde entre les deux positions est la constante d'échange k (s^{-1}).

L'échange sera dit lent lorsque nous sommes capables d'observer pour ce noyau simultanément ces deux environnements, soit lorsque $k \ll \Delta\nu$, c'est à dire que le temps de résidence du noyau dans chacune de ces positions est long.

La deuxième situation est le cas où le noyau échange rapidement entre ces deux environnements. Un déplacement chimique unique est observé, il va correspondre au déplacement chimique moyen des deux environnements occupés par le noyau. La constante d'échange k est telle que $k \gg \Delta\nu$.

En solution, la constante d'échange k est une constante moléculaire (Kaplan, 1996). Le phénomène d'échange est aléatoire et gouverné par le mouvement Brownien des molécules en solution: le phénomène est non déterministe. Si nous connaissons la position d'une molécule à l'instant t , il nous est impossible de connaître sa position exacte à l'instant $t + \Delta t$.

Cas d'un solide

Dans un solide, un noyau est autorisé non pas à occuper uniquement deux environnements mais un très grand nombre. A un environnement du noyau va correspondre un déplacement chimique. Ce phénomène pourrait s'apparenter à un phénomène d'échange chimique multi-positions, où la largeur de raie statique $\Delta\nu$ définit les environnements "extrêmes" que le noyau peut occuper dans le solide. Les atomes étant fixes (ou très peu mobiles), tous les environnements sont observés sous une enveloppe très large $\Delta\nu$: l'échange chimique est très lent.

Introduisons du mouvement macroscopique apporté par la rotation rapide (ω_r) de l'échantillon à l'angle magique. Les mouvements macroscopiques de rotation vont entraîner des mouvements microscopiques pour chaque noyau, qui va parcourir l'enveloppe statique des glissements chimiques. Ce dernier phénomène est comparable au phénomène d'échange chimique

en solution. Si nous augmentons la vitesse de rotation jusqu'à ce que celle-ci soit supérieure à la largeur de raie statique $\Delta\nu$, un environnement unique moyen pour chaque noyau de la molécule sera observé. L'échange est devenu rapide, la constante d'échange ω_r est telle que $\omega_r > \Delta\nu$. Nous retrouvons la condition sur la vitesse de rotation à l'angle magique: la vitesse de rotation ω_r doit être supérieure à la largeur de raie statique pour supprimer les élargissements statiques de raie.

Pour un solide en rotation à l'angle magique, la constante d'échange est un paramètre que l'on maîtrise parfaitement: c'est la vitesse de rotation ω_r . Connaissant la position d'un atome à un instant t , nous pouvons déterminer sa position exacte à l'instant $t + \Delta t$: le phénomène est déterministe.

Ces deux constantes d'échange, k et ω_r ont exactement le même mécanisme d'action, mais des origines complètement différentes. L'une est déterministe (ω_r), l'autre ne l'est pas (k).

3.3.5 Description du Hamiltonien d'interaction dipolaire sous la rotation à l'angle magique

Lorsque l'échantillon est placé dans un rotor qui tourne à la vitesse ω_r autour d'un axe décalé d'un angle β par rapport à la direction du champ \mathbf{B}_0 , tous les vecteurs internucléaires \mathbf{r}_{jk} , reliant les dipôles magnétiques \mathbf{m}_j et \mathbf{m}_k , vont décrire des mouvements de rotation autour de la direction de l'axe du rotor (Figure I.9 (b)). Les angles θ_{jk} (angle entre le vecteurs \mathbf{r}_{jk} et \mathbf{B}_0) seront dépendants du temps, et la dépendance angulaire $(3 \cos^2 \theta_{jk}(t) - 1)$ des termes A et B du Hamiltonien dipolaire aura des valeurs qui pourront être positives ou négatives.

Pour mieux comprendre l'effet de la rotation rapide de l'échantillon à l'angle magique, il est plus commode de se placer dans le référentiel du laboratoire, c'est à dire le référentiel de la rotation ω_r (Figure I.10). Nous pouvons exprimer le Hamiltonien d'interaction dipolaire dans le référentiel du laboratoire pendant la rotation ω_r , celui-ci a pour expression pour un ensemble de spins j (le calcul détaillé est réalisé en l'Annexe I.2):

$$\mathcal{H}_{\text{dipolaire}}^{\text{Lab.}}(t) = \sum_{j < k} \frac{\gamma_j \gamma_k \hbar}{2 r_{jk}^3} (3 I_{jz} I_{kz} - \mathbf{I}_j \cdot \mathbf{I}_k) \left\{ \begin{aligned} & \frac{3 \cos^2 \beta'' - 1}{2} \frac{3 \cos^2 \beta'_{jk} - 1}{2} \\ & + \mathcal{D}_{\pm 1 0}^2(\Omega'_{jk}) \sin 2\beta'' e^{\pm i \omega_r t} \\ & + \mathcal{D}_{\pm 2 0}^2(\Omega'_{jk}) \sin^2 \beta'' e^{\pm 2i \omega_r t} \end{aligned} \right\}$$

- ω_r est la vitesse de rotation du rotor

- β'' est l'angle entre l'axe de rotation du rotor et la direction du champ \mathbf{B}_0

- β'_{jk} est l'angle entre l'axe de rotation du rotor et la direction du vecteur \mathbf{r}_{jk}

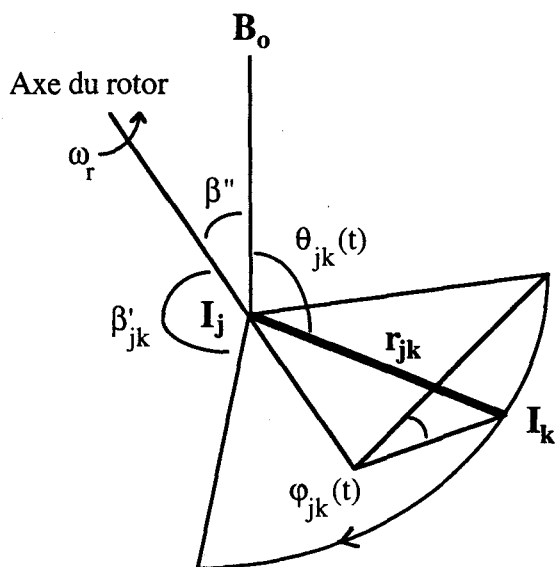


Figure I.10

Nous pouvons distinguer deux termes dans cette expression du Hamiltonien dipolaire.

Un terme indépendant du temps

Le premier terme \mathcal{H}_1 , est responsable de l'élargissement dipolaire. Il est indépendant du temps, et est nul lorsque le rotor est en rotation le long de la direction de l'angle magique $\beta'' = 54^\circ 7'$.

Sous rotation rapide à l'angle magique, l'élargissement dipolaire est moyenné à zéro.

$$\mathcal{H}_1 = \sum_{j < k} \frac{\gamma_j \gamma_k \hbar}{2 r_{jk}^3} (3 I_{jz} I_{kz} - \mathbf{I}_j \cdot \mathbf{I}_k) \left\{ \frac{3 \cos^2 \beta'' - 1}{2} \frac{3 \cos^2 \beta_{jk}' - 1}{2} \right\}$$

Si nous posons $F(\beta'') = \left| \frac{1}{2} (3 \cos^2 \beta'' - 1) \right|$

Nous obtenons

$$\mathcal{H}_1 = F(\beta'') \sum_{j < k} \frac{\gamma_j \gamma_k \hbar}{2 r_{jk}^3} (3 I_{jz} I_{kz} - \mathbf{I}_j \cdot \mathbf{I}_k) \frac{3 \cos^2 \beta_{jk}' - 1}{2}$$

$$\beta'' = \frac{\pi}{2} \quad F(\beta'') = \frac{1}{2}$$

$$\beta'' = 0 \quad F(\beta'') = 1$$

$$\beta'' = 54^\circ 7' \quad F(\beta'') = 0 \quad \text{condition de l'angle magique}$$

La fonction $F(\beta'')$ montre que la rotation du rotor le long de la direction du champ \mathbf{B}_0 n'a aucun effet sur l'élargissement dipolaire. Si le rotor est en rotation à 90° par rapport à \mathbf{B}_0 , il y a réduction de moitié de l'élargissement dipolaire.

Il est important de noter que l'ajustement de l'angle magique doit être soigneusement réalisé. Toute variation angulaire ε va entraîner une nouvelle source d'élargissement de $\sqrt{2} \varepsilon$ fois la contribution dipolaire statique.

$$F(\beta'' + \varepsilon) \approx \sqrt{2} \varepsilon$$

Un terme dépendant du temps

Le second terme \mathcal{H}_2 , est dépendant du temps et périodique: il varie en ω_r et en $2 \omega_r$. Il sera moyenné à zéro à haute vitesse, car il varie faiblement et rapidement dans le temps. Ce terme est à l'origine de l'apparition de bandes de rotations espacées du multiple de la vitesse de rotation ω_r .

$$\mathcal{H}_2(t) = \sum_{j < k} \frac{\gamma_j \gamma_k \hbar}{2 I_j I_k} (3 I_{jz} I_{kz} - \mathbf{I}_j \cdot \mathbf{I}_k) \left\{ \begin{aligned} & \mathcal{D}_{\pm 1 0}^2(\Omega'_{jk}) \sin 2\beta'' e^{\pm i \omega_r t} \\ & + \mathcal{D}_{\pm 2 0}^2(\Omega'_{jk}) \sin^2 \beta'' e^{\pm 2i \omega_r t} \end{aligned} \right\}$$

3.4 L'Anisotropie de déplacement chimique

3.4.1 Définition

Le déplacement chimique est une interaction du type électron-noyau qui ne dépend que de la distribution spatiale des électrons autour du noyau. Sous l'effet du champ magnétique externe \mathbf{B}_0 , il y a précession de Larmor des électrons périphériques autour du noyau et une déformation des orbitales électroniques due aux électrons des noyaux voisins. Cela se traduit par l'apparition de champs magnétiques locaux proportionnels à \mathbf{B}_0 , qui s'opposent ou s'ajoutent à la direction du champ externe \mathbf{B}_0 : il s'agit du phénomène d'écrantage ou de déplacement chimique. Ainsi le noyau

n'interagit pas avec le champ magnétique externe \mathbf{B}_0 mais avec un champ effectif $(1 - \overline{\sigma}) \cdot \mathbf{B}_0$, où $\overline{\sigma}$ représente le tenseur d'anisotropie de déplacement chimique (voir Annexe I.4).

Le Hamiltonien, décrivant l'interaction des spins nucléaires j avec le champ magnétique externe \mathbf{B}_0 et l'anisotropie de déplacement chimique, s'exprime par:

$$\mathcal{H} = - \sum_j \gamma_j \hbar I_j \cdot (1 - \overline{\sigma}) \cdot \mathbf{B}_0$$

3.4.2 Le Hamiltonien d'anisotropie de déplacement chimique

L'anisotropie de déplacement chimique, comme l'interaction dipolaire, est une interaction tensorielle. Le Hamiltonien d'anisotropie de déplacement chimique dans le référentiel du laboratoire peut être décrit par l'expression suivante (voir Annexe I.4):

$$\mathcal{H}_\sigma^{\text{Lab}} = \gamma_j \hbar I_{jz} \left\{ \sigma_{\text{iso}} + \frac{\delta\sigma}{2} (3 \cos^2 \beta - 1 - \eta_\sigma \sin^2 \beta \cos 2\alpha) \right\}$$

où (α, β) sont les angles polaires décrivant les axes propres du tenseur d'anisotropie de déplacement chimique $\overline{\sigma}$ par rapport à \mathbf{B}_0 . Les paramètres σ_{iso} , $\delta\sigma$ et η_σ sont le déplacement chimique isotrope, l'anisotropie de déplacement chimique et le paramètre d'asymétrie respectivement.

cas d'un liquide

En solution, par suite des mouvements moléculaires rapides et aléatoires, seule la partie isotrope σ_{iso} du tenseur $\overline{\overline{\sigma}}$ est observée, car nous avons:

$$\int_0^{2\pi} \int_0^{\pi} (3 \cos^2 \theta - 1 + \eta_{\sigma} \sin^2 \theta \cos 2\varphi) \sin \theta \, d\theta \, d\varphi = 0$$

Cas d'un solide

Dans un solide, où toutes les orientations spatiales sont possibles pour un noyau, un déplacement chimique différent sera observé pour ce noyau pour chacune des orientations que celui-ci aura dans l'espace: c'est son anisotropie de déplacement chimique. Le spectre résultant est une superposition des raies élémentaires correspondant à chacune des orientations. Si nous faisons tourner l'échantillon à l'angle magique sous une vitesse ω_r supérieure à l'anisotropie de déplacement chimique, le spectre se réduit à l'observation du déplacement chimique isotrope σ_{iso} pour chacun des noyaux: l'anisotropie de déplacement est alors moyennée à zéro. Si la vitesse de rotation est plus petite que l'anisotropie de déplacement chimique, il apparaîtra pour chaque raie des bandes de rotation distantes les unes des autres de la fréquence de rotation ω_r .

3.5 Les discontinuités de susceptibilité magnétique dans les composés sur support solide

3.5.1 Les discontinuités internes de susceptibilité magnétique

3.5.1.1 Origine

Pour toute expérience RMN, un champ magnétique externe B_0 uniforme est appliqué sur une échelle significativement plus grande que l'échelle moléculaire. Le champ magnétique externe B_0 est très homogène, mais l'introduction dans ce champ homogène d'un élément de volume quelconque avec une susceptibilité magnétique donnée modifie le champ interne ressenti à la fois à l'intérieur et à l'extérieur de l'élément de volume, créant des déviations de ligne de champ.

La forme ellipsoïdale est la forme géométrique, qui dans un champ magnétique externe uniforme donne lieu à un champ magnétique interne le plus uniforme possible. Le cylindre de longueur infinie et la sphère sont des ellipsoïdes de révolution. Ce type de géométrie, approximant une ellipsoïde, est la forme que possèdent les échantillons à analyser en RMN (Garroway, 1982; Barbara, 1994).

3.5.1.2 Les composés sur support solide

Les composés sur support solide sont constitués d'une matrice solide (domaine (a) Figure I.1), dont la forme s'apparente à une bille. Les billes sont par nature toutes différentes en taille et en forme, cependant elles sont généralement assimilées à des sphères. Les molécules synthétisées (domaine (d) Figure I.1) sont attachées par les bras moléculaires (domaines (b) et (c) Figure I.1) aux réticulations de la bille qui se trouvent à sa surface et à l'intérieur. Définissons une entité constituée de la bille de résine supportant les molécules synthétisées. Chaque entité est définie par de petits domaines de susceptibilité magnétique différente (voir § B.2 et § B.3.1.4). Comme la taille du réseau de réticulation de la bille est très grande devant la longueur des chaînes moléculaires synthétisées, on considère que la forme globale d'une entité correspondra à celle de la bille, c'est à dire à une sphère.

Soit une entité introduite dans le champ magnétique uniforme B_0 . Nous pouvons calculer la distribution des champs magnétiques internes à l'intérieur de chaque entité de la manière suivante. En un point de l'entité, où l'on désire calculer le champ magnétique interne ressenti, définissons

une cavité sphérique élémentaire V qui sera la plus grande sphère de même susceptibilité magnétique existant en ce point. Subdivisons le volume restant de l'entité en volumes sphériques j , de volume V_j , de façon à considérer le volume entier de l'entité (Figure I.11). Réalisons cette subdivision pour chaque entité de l'échantillon.

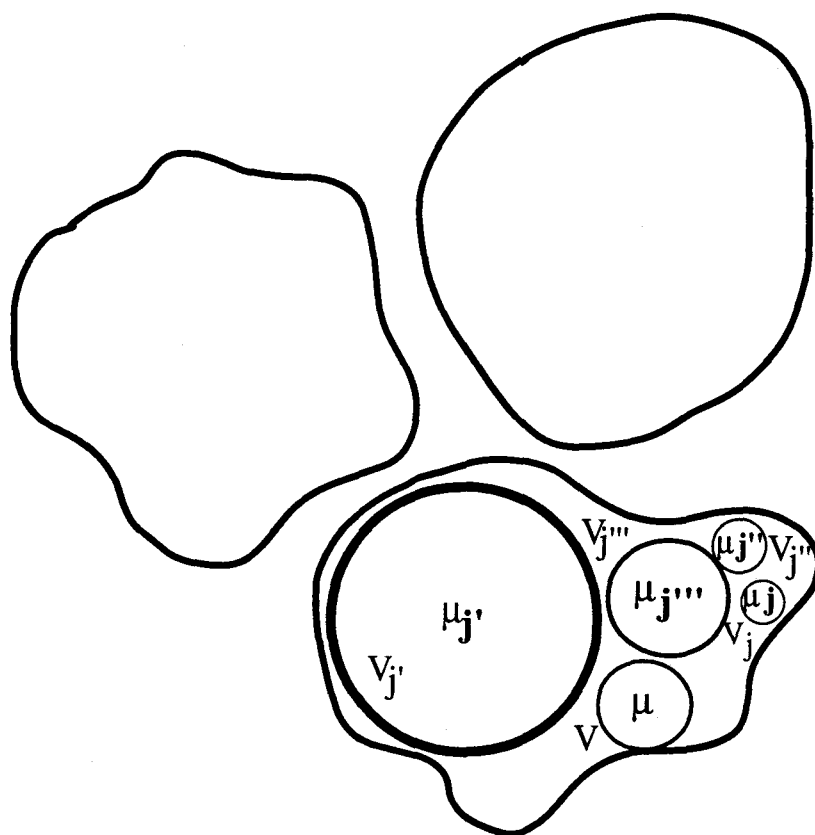


Figure I.11

Le champ magnétique interne ressenti par chaque sphère sera la somme (i) du champ magnétique externe homogène \mathbf{B}_0 , (ii) avec le champ du à la polarisation uniforme de la cavité sphérique dans le champ \mathbf{B}_0 , et (iii) avec la contribution des champs dipolaires locaux créés par les autres sphères environnantes de susceptibilité magnétique différente (VanderHart, 1996). Dans le cas d'une cavité sphérique (facteur démagnétisant 1/3), la contribution en champ interne d'une sphère, provenant de la polarisation de cette sphère dans le champ \mathbf{B}_0 , est annulée par le champ

démagnétisant. Chacune des sphères va présenter un moment dipolaire macroscopique μ . Le champ magnétique ressenti par une sphère sera le champ magnétique externe \mathbf{B}_0 et toutes les contributions des champs dipolaires créés par les autres sphères j : il s'agit maintenant d'interaction dipolaire macroscopique. Ces contributions en champ dipolaire (par unité de volume) peuvent s'exprimer par:

$$\frac{1}{4\pi} \sum_j \frac{3 (\mu_j \cdot \mathbf{r}_j) \cdot \mathbf{r}_j - r_j^2 \mu_j}{r_j^5}$$

Après projection selon la direction du champ magnétique externe \mathbf{B}_0 et en coordonnées polaires, nous obtenons:

$$\frac{1}{4\pi} \sum_j \frac{3 \cos^2 \theta_j - 1}{r_j^3}$$

r_j représente la distance entre le centre de la sphère de volume V et le centre d'une autre sphère j . θ_j est l'angle entre la direction du vecteur \mathbf{r}_j et du champ externe \mathbf{B}_0 .

Chacune de ces interactions dipolaires, d'origine macroscopique, va être moyennée à zéro par la rotation rapide de l'échantillon à l'angle magique. Ces interactions dipolaires macroscopiques vont être éliminées de la même manière que les interactions dipolaires microscopiques (voir § B.3.3.3).

Les fortes discontinuités de susceptibilité magnétique, existant à l'intérieur de l'échantillon, dues aux nombreux interfaces, notamment lorsque la résine est gonflée (solvant / billes gonflées), vont être moyennées conduisant à une susceptibilité magnétique quasi-isotrope dans l'échantillon.

La contribution des inhomogénéités de susceptibilité magnétique à l'élargissement des raies a déjà été mise en évidence en RMN du solide par Stoll (Stoll & Majors, 1981). Sur un composé de

NbH_x présentant une largeur de raie statique en ^1H de 13 kHz, ceci malgré des valeurs de $T_1 \approx 75$ ms et $T_{1\rho} \approx 35$ ms, Stoll a montré qu'une vitesse de rotation à l'angle magique nettement inférieure (3.4 kHz) permettait de réduire de plus d'un facteur 4 la largeur de raie statique. La contribution dominante responsable de l'élargissement statique a alors été attribuée aux fortes discontinuités de susceptibilité magnétique à l'intérieur de l'échantillon.

3.5.2 Les discontinuités externes de susceptibilité magnétique

Des inhomogénéités de susceptibilité magnétique vont persister sans être affectées par la rotation à l'angle magique. Ces dernières ne proviennent plus de l'échantillon mais de la sonde de mesure RMN. Ces discontinuités de susceptibilité magnétique proviennent des composants électroniques et mécaniques de la sonde. Si ces composants sont disposés de manière asymétrique à l'intérieur de la sonde, cela va perturber le champ ressenti au niveau de la bobine de mesure. La solution peut être de disposer de manière symétrique ces composants, et de les éloigner dans la mesure du possible de la bobine pour limiter leurs effets perturbateurs.

Modifier certains des composants de la sonde peut aussi améliorer la résolution, par exemple en remplaçant le matériau de la bobine radiofréquence par un matériau de susceptibilité magnétique la plus proche de celle de l'air (Fucks *et al.*, 1992).

Pour les composés en phase solide, une procédure de shimming de la sonde se révèle toujours être une étape indispensable avant l'expérience pour réduire au maximum les inhomogénéités macroscopiques de champ à l'intérieur de l'échantillon.

3.6 La technique RMN MAS des composés en phase solide

3.6.1 Le gonflement de la résine et la rotation à l'angle magique

Le spectre statique en ^1H , lorsque la résine est sèche, présente une raie très large (≈ 10 kHz) complètement inexploitable (Figure I.3 (A)). La rotation rapide à l'angle magique (jusqu'à 5 kHz), n'apporta aucune amélioration sur la résolution du spectre (Figure I.3 (B)). Actuellement la vitesse maximale que nous savons atteindre avec l'unité pneumatique de notre spectromètre est de l'ordre de 7 kHz, il est dans ces conditions impossible d'obtenir un spectre ^1H résolu de l'échantillon lorsque la résine est sèche. Les interactions de CSA, de dipolaire et les discontinuités de susceptibilité magnétique à l'intérieur de l'échantillon sont beaucoup trop importantes pour pouvoir être éliminées par le MAS.

Il est intéressant de noter que le gonflement seul de la résine ne permet pas non plus d'obtenir un spectre résolu en ^1H (Figure I.3 (C)): le spectre reste large et non résolu (≈ 0.6 kHz). Cette remarque montre que le gonflement de la résine et la rotation à l'angle magique sont des paramètres essentiels. Ces deux conditions doivent être impérativement remplies pour l'analyse par RMN de composés sur support solide. Une entorse à cette observation existe cependant, elle ne concerne pas le ^1H mais le ^{13}C . En effet, la dispersion des déplacements chimiques du ^{13}C étant large (≈ 200 ppm) devant celle du ^1H (≈ 10 ppm), les problèmes de largeur de raie sont moins critiques en ^{13}C . Ce qui explique que des spectres résolus en ^{13}C peuvent être obtenus sur des échantillons de résines gonflées sans avoir recours au MAS (Giralt *et al.*, 1984; Look *et al.*, 1994).

Si maintenant nous combinons la technique de rotation de l'échantillon à l'angle magique avec le gonflement des billes de résine, des résultats qui approchent ceux de la RMN liquide haute résolution peuvent être obtenus pour les composés sur support solide (Figures I.3 (D) et (E)). Les résonances associées aux molécules attachées aux billes présentent une largeur de raie moyenne de l'ordre de 20 Hz en ^1H et de 10 Hz en ^{13}C . Les résonances de la matrice immobilisée demeurent non identifiables. Toutes les séquences d'impulsions de la RMN liquide peuvent être utilisées, et ainsi nous avons accès à l'identification complète des composés sur support solide.

3.6.2 La rotation à l'angle magique et les mouvements moléculaires

Dans l'échantillon, lorsque la résine est sèche, les mouvements moléculaires sont très réduits. Les atomes occupent des positions figées et leurs orientations fixes sont aléatoirement réparties dans l'espace. Les interactions dipolaires, de CSA, et les inhomogénéités de susceptibilité magnétique sont très fortes et impossibles à éliminer par le MAS (Figure I.3 (B)). Le spectre ^1H résulte en une enveloppe très large (≈ 10 kHz) (Figure I.3 (A)).

Lorsque les billes de résine sont gonflées à l'aide d'un solvant, le volume macroscopique des billes augmente. La solvation de la matrice solide (domaine (a) Figure I.1) et des chaînes moléculaires (domaines (b), (c) et (d) Figure I.1) introduit un gradient de mobilité dans le système qui dépend de la manière dont chaque domaine (Figure I.1) est solvato. Les mouvements lents se situent au niveau de la matrice solide, alors que les mouvements plus rapides se situent en bout de chaîne moléculaire. La liberté de mouvement et l'espace conformationnel autorisés pour les molécules ancrées à la bille augmentent. Ces molécules se déplacent en se réorientant rapidement et de manière aléatoire, ce qui moyenne à zéro les interactions de CSA et dipolaires. Ainsi le gonflement de la résine conduit à une forte réduction (par un facteur 20) de l'élargissement de la raie statique en ^1H (≈ 0.6 kHz) (Figure I.3 (C)). Néanmoins le spectre reste inexploitable. C'est le caractère très hétérogène de l'échantillon qui, par les discontinuités de susceptibilité magnétique, contribue à cette largeur de raie résiduelle importante.

Lorsque l'échantillon est mis en rotation rapide à l'angle magique, les discontinuités de susceptibilité magnétique vont être moyennées et les interactions dipolaires macroscopiques vont être éliminées à la fois par les mouvements microscopiques des chaînes moléculaires et par les mouvements macroscopiques dus à la rotation à l'angle magique (Andrew, 1996; Stoll & Majors, 1981). Dans ce cas, les mouvements macroscopiques rendent les mouvements moléculaires microscopiques plus efficaces. Une vitesse de rotation de l'ordre de la largeur de raie résiduelle statique est suffisante pour faire apparaître des raies de résonances fines en ^1H pour les chaînes moléculaires (Figures I.3 (D) et (E)). Des vitesses de rotation plus importantes que la largeur de raie statique n'apportent aucune amélioration quant à la résolution des spectres. Cependant,

expérimentalement des vitesses de rotation de l'ordre de sept fois la largeur de raie résiduelle statique (soit $\omega_r = 4$ kHz), sont choisies de manière à ne pas observer de bandes de rotation dans le domaine intéressant des spectres en ^1H .

3.7 Tableau récapitulatif des élargissements en RMN MAS des composés en phase solide

Nous présentons en la Table I.1. un récapitulatif décrivant schématiquement l'intensité des différentes contributions responsables de l'élargissement des raies, et leur résultante après gonflement de la résine et sous rotation rapide de l'échantillon à l'angle magique.

Contribution à l'élargissement des raies	Résine sèche	Résine gonflée	Résine gonflée sous MAS à 4 kHz
Anisotropie de déplacement chimique (CSA)	++++	+	≈ 0
Interaction dipolaire $^1\text{H} - ^1\text{H}$	++++	+	≈ 0
Inhomogénéités microscopiques de susceptibilité magnétique (interfaces échantillon / rotor)	++	+++	+
Inhomogénéités macroscopiques de susceptibilité magnétique (composants de la sonde)	++++	++++	++ corrigées par le shimming
Largeur de raie ^1H	≈ 10 kHz	< 1 kHz	≈ 20 Hz (^1H) ≈ 10 Hz (^{13}C)

Table I.1

3.8 Aspects expérimentaux et pratiques

3.8.1 Le gonflement de la résine

Pour l'analyse par RMN MAS de composés sur support solide, la préparation de l'échantillon est primordiale afin d'obtenir une bonne résolution (Kiefer, 1996). C'est la capacité du solvant à gonfler les billes de résine (domaine (a) Figure I.1) et les molécules ancrées qui va déterminer la mobilité des chaînes moléculaires (domaine (d) Figure I.1). Les molécules de solvant vont pénétrer les billes pour les gonfler en solvatant les molécules ancrées (domaine (d) Figure I.1) et la matrice solide (domaine (a) Figure I.1). Plus le volume macroscopique des billes gonflées sera important, plus la mobilité des chaînes moléculaires qui y sont greffées sera importante.

Tester la capacité de différents solvants à gonfler la résine, permet de déterminer avant l'analyse par RMN MAS les meilleures conditions expérimentales. La mesure sous microscope binoculaire du diamètre moyen des billes gonflées permet d'estimer la capacité d'un solvant à gonfler la résine. Nous utiliserons le paramètre V_r , qui désigne le rapport du volume moyen d'une bille gonflée sur le volume moyen d'une bille sèche (Tam & Lu, 1995). Le solvant présentant le V_r le plus élevé sera le solvant le plus approprié à solvater l'échantillon. Ces mesures n'entraînent pas de perte d'échantillon, car ce dernier peut être ensuite séché et réutilisé. Pour l'analyse par RMN MAS, les solvants utilisés pour gonfler la résine sont deutérés pour éviter l'apparition de signaux ^1H intenses issus du solvant, mais aussi de manière à utiliser le ^2H pour le signal de lock.

3.8.2 L'analyse

Pour toute analyse RMN, il est nécessaire d'avoir un champ magnétique externe homogène. Les inhomogénéités de champ magnétique sont corrigées par une procédure de shimming. Pour un échantillon liquide cylindrique, le shimming est facile à réaliser du fait de la symétrie axiale de l'échantillon. Pour un échantillon solide, les inhomogénéités locales de champ magnétique sont moins critiques en raison de la largeur de raie intrinsèque très importante. Par contre pour un composé sur support solide (lorsque la résine est gonflée) placé en rotation à l'angle magique, la

situation est bien plus critique. Bien que les contributions locales aux inhomogénéités de champ, dues au caractère très hétérogène de l'échantillon soient en grande partie moyennées par le MAS, des inhomogénéités macroscopiques de champ magnétique demeurent. Ces perturbations proviennent des interfaces rotor / échantillon et des composants de la sonde. Une procédure de shimming est alors très importante. Le manque de symétrie axiale de l'échantillon à l'angle magique et le rapport (longueur du rotor / diamètre du rotor) défavorable modifient complètement la procédure de shimming habituellement employée pour un échantillon liquide cylindrique. La méthode consiste à compenser les inhomogénéités de champ essentiellement par les bobines de champ X, Y, XY, (X^2-Y^2) , X^3 et Y^3 , et ensuite à affiner avec la bobine de shim Z et ses ordres supérieurs. Dans notre procédure de shimming, le niveau des inhomogénéités de champ a été évalué en utilisant l'intensité du signal de lock du ^2H du solvant deutéré servant à gonfler la résine. Pour cela la bobine associée au canal de détection X de la sonde a été accordée sur la fréquence du ^2H . Ainsi une raie parfaitement symétrique avec une largeur à mi-hauteur de 2 Hz (à 300 MHz pour le ^1H) peut être obtenue pour un échantillon statique d'eau (80% H_2O / 20% D_2O) à l'angle magique.

3.8.3 Considérations pratiques

Pour l'analyse, une quantité de 30 mg de résine supportant la molécule synthétisée est nécessaire pour remplir complètement un rotor de 4 mm de diamètre. Le gonflement de la résine se fait avec un solvant deutéré, il peut être réalisé directement dans le rotor, mais il est préférable de le faire préalablement à l'extérieur dans un eppendorf. Le gonflement peut être effectué en mélangeant à l'aide d'une pipette le solvant à la résine, le gel ainsi formé peut ensuite être légèrement agité. Une petite quantité (2 à 5 microlitres) de tétraméthylsilane (TMS) peut être ajoutée à la résine gonflée pour servir de référence pour les déplacements chimiques ^1H et ^{13}C . Tout type de solvant organique ou combinaison de solvants peut être utilisé pour le gonflement. Dans certaines cas, un chauffage de la résine est utile pour faciliter le gonflement. La quantité de solvant à ajouter à la résine sèche est à déterminer avec précaution, car il faut éviter d'avoir dans le rotor deux phases: une phase gel et une phase liquide de solvant. Une quantité trop importante de solvant dans le rotor pourrait rendre difficile la rotation stable du rotor à l'angle magique.

Après avoir mis le rotor en rotation à l'angle magique, il est nécessaire d'accorder le canal de détection X de la sonde pour pouvoir utiliser le signal de lock du ^2H du solvant. Cette configuration permet le shimming de la sonde, et pourra être maintenue pour toutes les expériences homonucléaires, mais sera modifiée pour les expériences hétéronucléaires car ces dernières nécessitent l'utilisation du canal X pour l'observation du ^{13}C par exemple. Une vitesse de rotation de 4 kHz à 300 MHz pour le ^1H , est suffisante pour supprimer les élargissements de raie et obtenir des bandes de rotation hors du spectre ^1H .

C. La technique RMN MAS appliquée à la synthèse en phase solide

1. Suivi complet d'une synthèse organique

en phase solide: la réaction de Heck

1.1 Introduction

Deux stratégies sont actuellement connues pour générer des bibliothèques de petites molécules organiques: la synthèse en phase homogène (Gravert & Janda, 1996) et la synthèse en phase solide (Gordon *et al.*, 1994; Gallop *et al.*; 1994). Dans le domaine de la synthèse organique, la synthèse en phase homogène est largement employée depuis très longtemps, alors que la synthèse en phase solide n'a que très récemment fait l'objet de beaucoup d'attention. C'est notamment la facilité à séparer la molécule synthétisée des excès de solvants, de réactifs et d'impuretés qui fait que cette technique se développe en synthèse organique, alors qu'elle était appliquée depuis plusieurs décennies dans le domaine de la chimie des peptides (Merrifield, 1963).

L'un des problèmes majeurs dans le développement de nouvelles synthèses en phase solide est le manque de techniques analytiques non destructrices permettant la caractérisation des composés sur le support solide. Ceci vient du fait que les techniques d'analyse utilisées pour la synthèse en phase homogène sont inadaptées pour la phase solide.

Récemment, la technique RMN MAS combinée avec le gonflement de la matrice solide, s'est révélée être la méthode d'analyse de choix pour caractériser les composés organiques sur support solide. Nous nous sommes intéressés ici au suivi par la technique RMN MAS de la réaction de Heck en phase solide (Hiroshige *et al.*, 1995). Cette réaction présente un grand intérêt notamment en synthèse combinatoire car elle permet d'explorer un grand nombre de bibliothèques de petites molécules par la génération de liaisons carbone-carbone.

1.2 Suivi complet d'une synthèse organique en phase solide

incluant la réaction de Heck

Chapter 23

Magic-Angle Spinning NMR Spectroscopy of Polystyrene-Bound Organic Molecules

Monitoring a Three-Step Solid-Phase Synthesis Involving a Heck Reaction

Christophe Dhalluin, Iuliana Pop, Benoit Déprez, Patricia Melnyk,
André Tartar, and Guy Lippens

Chimie des Biomolécules, Unité Recherche Associée, Centre National
de la Recherche Scientifique 1309, Institut Pasteur de Lille,
1 rue du Pr Calmette, 59019 Lille Cédex, France

Organic synthesis by solid phase methods is emerging as a powerful tool for the combinatorial synthesis of large arrays of small molecules. The major difficulty in organic solid phase synthesis development lies in the structure determination of the compounds still tethered to the insoluble matrix. Until now, cleavage of the tethered molecule from the support and classical homogeneous phase methods were employed for the control of products synthesized on solid supports. Recently, the possibility of performing NMR analysis of polymer-linked molecules has been reported. We report here the MAS NMR gel phase monitoring of a three-step synthesis performed on a divinylbenzene crosslinked polystyrene. Theoretical and experimental aspects of the MAS NMR technique applied to organic solid phase synthesis are discussed.

High-resolution Magic Angle Spinning (MAS)^{1,2} NMR has recently attracted considerable attention as a method to analyze the products resulting from organic solid-phase synthesis (SPS) without the need of cleaving them from their solid support.³⁻⁵ Whereas the NMR assignment of compounds still attached to the insoluble matrix using the standard high resolution techniques remains a real challenge due to the line broadening caused by the restricted molecular motion of the molecules on the polymer beads and by the bulk magnetic susceptibility discontinuities in the rotor, the use of the MAS technique has allowed to overcome some of these limitations. In this report, we explore a number of experimental factors and their influence upon the quality of the NMR spectra, we discuss the general assignment strategy of a compound on a bead and exploit the previous results to demonstrate the step-by-step assignment of a chemical reaction without the cleavage of the intermediate products.

The solvent motion in the polymer network leads to chain expansion observable on a macroscopic scale as a swelling of the bead and is accompanied by an enhanced local mobility of the attached molecules at the microscopic level. As a consequence of the enhanced molecular mobility the various interactions that govern the line width of the NMR signal will be motionally averaged, including the homonuclear dipolar interaction that can broaden proton signals up to values of 20 kHz in a static solid state sample. This motional averaging may be incomplete, due to the anisotropic environment of the solvent molecules in the polymer. The resulting residual dipolar broadening can be further reduced by spinning the sample at the magic angle at a spinning rate higher than the non-spinning residual line width. This last condition on the spinning rate can be advantageously exploited to suppress the lines of the more rigid supporting polymer while obtaining a liquid-like spectrum for the more mobile attached molecules.

MAS will also eliminate the magnetic-susceptibility broadening caused by the difference in (electronic) magnetic susceptibility between the polymer and the pure solvent, combined with the irregular shape of the solvent/polymer interface.³⁻⁵ Although removed by the same experimental operation of spinning the sample at relatively low speeds (a few kHz), the two phenomena of dipolar broadening and magnetic-susceptibility broadening should be clearly distinguished. This distinction was made very early in a pioneering study on the NMR behaviour of hydrogen trapped in NbH_x .⁶ The hydrogen diffusion is rapid enough to remove any homonuclear and heteronuclear dipolar broadening, but static linewidth for the proton signal as large as 13 kHz was observed.⁶ Still, this static line width was accompanied by T_1 and $T_{1\rho}$ values superior to 10 ms, indicating that the broadening was entirely due to spatial inhomogeneities. The authors convincingly showed that it could be considerably narrowed down by spinning the sample at a rate largely inferior to 13 kHz.

We will show that in the case of MAS NMR on the support-attached products of solid-phase synthesis a spinning rate of 2 kHz, easily obtainable on a standard solid state probe, is sufficient to eliminate to a large extent both mechanisms of line broadening mentioned above, at the condition that certain experimental parameters of solvent and bead structure are obeyed. The influence of solvent and swollen bead structure with its linker on the resulting spectra can be understood in the framework of the motional averaging as described above. Observation of these simple rules leads to 1D and 2D homonuclear and heteronuclear spectra allowing the complete attribution of structurally complex molecules.

NMR Technical Aspects.

Whereas the first results of MAS NMR in SPS were presented using a specially designed probe (the 'Nano-probe', Varian NMR Instruments, Palo Alto)^{3,7}, it readily became clear that completely satisfactory results could be obtained on a standard MAS probe.^{4,5} In the present work, we continue along the last lines: all our results were obtained on a Bruker 300 MHz DRX spectrometer, equipped with a pneumatic unit and a standard 7 mm MAS probe.

In high resolution NMR spectroscopy, the homogeneity of the static magnetic field is of paramount importance for the quality of the lineshape in a liquid sample, and is obtained by the well-known shimming procedure.⁸ In solid state NMR, however, the intrinsic line broadening is such that extensive shimming is normally neglected. For the applications described here, it is clear that shimming - though different from the procedure used on an axially symmetric liquid sample - will be of uttermost importance. Indeed, whereas the local contribution to the field inhomogeneity (due to the many irregular surfaces) will be averaged out by MAS, the macroscopic field inhomogeneity (due to probe design, the various interfaces rotor/sample,...) should be minimized by the shimming procedure.

In high-resolution liquid NMR, the level of field homogeneity is usually evaluated from the intensity of the field lock dispersion curve.⁹ The conventional 7 mm MAS solid state probe we used possesses no dedicated lock channel, but is equipped with two detection channels for the ¹H and X nuclei. For the initial shimming, the X channel was set to the ²H nucleus frequency, and the probe was properly tuned in ²H, allowing ready use of this coil for a field frequency lock. The adjustment of the shim coils has been performed by using the magnitude of the field frequency lock signal. This homology with the situation normally encountered in liquid high-resolution NMR facilitated the shimming protocol, and proved to be easier than shimming on the decay of the envelope of the *Free Induction Decay* signal.

The lack of axial symmetry with respect to the main static field, and the unfavorable ratio of sample length/diameter leads to deviations from the habitual shimming protocol.^{10,11} The field inhomogeneities in the sample were compensated primarily by a fine adjustment of the radial shim coils X, Y, XY, (X²-Y²), X³ and Y³, and after that by a minor contributions of the Z coil and its higher order. A well symmetric signal with a final line width of 5 Hz could be obtained on the ¹H water resonance of a static sample of water (90%¹H₂O/10%²D₂O) oriented at the magic angle.

The frequency lock as implemented through the X coil was also used in homonuclear spectra to minimize drifts in the magnetic field during the data collection. For heteronuclear spectra, however, the X coil was set to the heteronucleus (¹³C), and these spectra were run without field locking. Still, field drifting was not important during the reasonably short duration of the HMQC spectra (3 hours), leading to high quality heteronuclear correlated spectra on the same standard MAS probe.

A spinning rate of 2 kHz was sufficient to obtain line narrowing and to avoid any spinning side bands in the ¹H spectra. For larger rates superior to 3 kHz, the rotation of the sample was harder to stabilize, and for some solvents the tightness of the rotor proved to be insufficient, leading to the escape of some solvent from the rotor. However, for samples where the higher spinning rate could be used, no significant improvement of the spectral quality was observed. Therefore, all further studies were performed at a 2 kHz spinning rate. Whereas the previous considerations are mainly concerned with the removal of as many as possible magnetic field inhomogeneities, a second important factor proved to be the residual dipolar coupling experienced by the attached molecules. This parameter is directly linked to the mobility of the molecules in the heterogeneous environment that are the swollen beads. It is not straightforward to evaluate this parameter, but in the next paragraph, we try to establish a correlation with the solvent-dependent swelling of the beads.

Physicochemical Characterization of the Resin Beads.

The preparation of the resin sample which has to be submitted to a MAS NMR experiment is extremely important to obtain workable data. One key issue is to find out the best swelling conditions for the resin sample. First, it is important to determine the minimal volume of solvent required to swell a given amount of resin. Indeed, a resin sample prepared for a MAS NMR experiment should macroscopically behave as a stable suspension of beads in the solvent. The bead packing occurring in the spinning rotor must not lead to the separation of two distinct phases as this would induce a deterioration of the magnetic field homogeneity. On the other hand, in terms of microscopic behaviour, as previously discussed, the mobility of the molecules tethered to the polymer is a determining factor for the resulting line width. This mobility depends itself on the solvation volume of the resin. We therefore tested different solvents on their ability to swell the resin, and set out to establish a correlation between this parameter and the resulting spectra.

Table 1. Solvation of the Wang-Lys(Boc)-Fmoc resin in different solvents.

entry	solvent	solvation volume ^a ($\mu\text{L}/100\text{ mg}$)	volume of swollen beads ($\mu\text{L}/100\text{ mg}$)	averaged diameter (μm)	volume ratio ^b
1	pyridine	700	1000	109.6	6.3
2	DCM	700	800	107.5	5.9
3	chloroform	750	900	103.4	5.4
4	benzene	620	900	102.9	5.2
5	DMF	540	900	92.7	3.8
6	DMSO	200	300	85.1	2.9

^a minimal volume of solvent required to swell 100 mg of dry resin. ^b the ratio of solvated volume and the volume of dry resin as calculated from the averaged diameters

The resin which was further used for the MAS NMR experiments was a commercially available 1 % divinylbenzene crosslinked polystyrene Wang-Lys(Boc)-Fmoc resin. The minimal volume of solvent required to swell 100 mg of resin was determined. 50 μL portions of solvent were added to a known quantity of resin until solvent saturation of beads (appearing of a liquid phase). The volume occupied by the resin beads swollen in the different solvents was measured using a graduated test tube. The swelling ability of different solvents, associated with the volume ratio (ratio of a solvated bead volume to the volume of the dry bead) was then established more precisely. The averaged diameter of the dry bead was 59.5 μm . The polymeric bead volumes were determined by direct measurement of their diameters under a light microscope provided with a micrometric ocular. For the solvated resin, beads (200 - 400 mesh) preswollen in the solvent were spread over a slide with a coverglass to minimize solvent evaporation. The resin beads proved to have even diameters so a total of about 100 beads for each determination was enough to determine an averaged diameter. For all these studies, six solvents were tested (Table 1).

The volume of solvent necessary to completely solvate the beads correlates well with the final volume occupied by the individual beads. A very low amount of dimethylsulfoxide (100 μL) was sufficient to completely solvate the beads, and the final volume ratio shows that dimethylsulfoxide (DMSO) does not efficiently penetrate into the polymeric network. The same rule was observed when comparing the solvation volumes for the other solvents, with pyridine needing a maximal solvation volume and showing the highest volume ratio. However, when we regard the volume of solvent needed to saturate the beads with respect to the final macroscopic volume of the swollen beads (and not with the individual bead volume), the correlation is not obvious. Indeed, we observe an almost constant volume of the swollen beads (about 900 $\mu\text{L}/100$ mg resin), despite the different solvation volume used. This would indicate that larger swollen beads (eg. for pyridine) pack more closely than the smaller ones (eg. for N, N - dimethylformamide), leading to a similar final volume. Although we presently do not understand very well the underlying phenomenon, the resulting NMR spectra (see below) show very similar line widths, indicating that the mobility of the tethered molecules is not directly affected.

A good solvation of the bead is likely to be related to a wide relaxation of the polymeric framework and an improved mobility of the tethered molecules. The inability to obtain workable NMR data for the resin swollen in deuterated DMSO can be correlated to its poor swelling ability. The motional freedom for the internal molecules, which represent more than 99 % of the tethered molecules, is probably more restricted when using the DMSO than for the other solvents. Good resolution was obtained when the polymeric beads were swollen in deuterated pyridine, but spectra of comparable quality were obtained when working in deuterated N, N - dimethylformamide (DMF) as well as in deuterated chloroform, dichloromethane (DCM) or benzene. There probably exists a threshold for the solvation volume above which the mobility of the tethered molecules becomes important enough to reduce the residual dipolar coupling.

The MAS ^1H spectra exposed sharp resonances with a line width of 21 Hz in deuterated chloroform, DCM, pyridine and DMF and of 32 Hz in deuterated benzene. The signals in the ^{13}C MAS spectra have an average line width of 13 Hz in each solvent. The high motional freedom exhibited by the protected lysine bound to the solvent swollen beads results in solution-like properties and hence in sharp resonances. These entirely satisfactory resolutions in ^1H and ^{13}C obtained with a conventional MAS probe are of similar quality to that obtained with a 'Nano' probe.³

Since swelling properties of a resin depends on the nature of the growing molecule fixed on the polymer - a fact well known to solid phase chemists - it is likely that a systematic study of the swelling should be performed after each step of the synthesis.

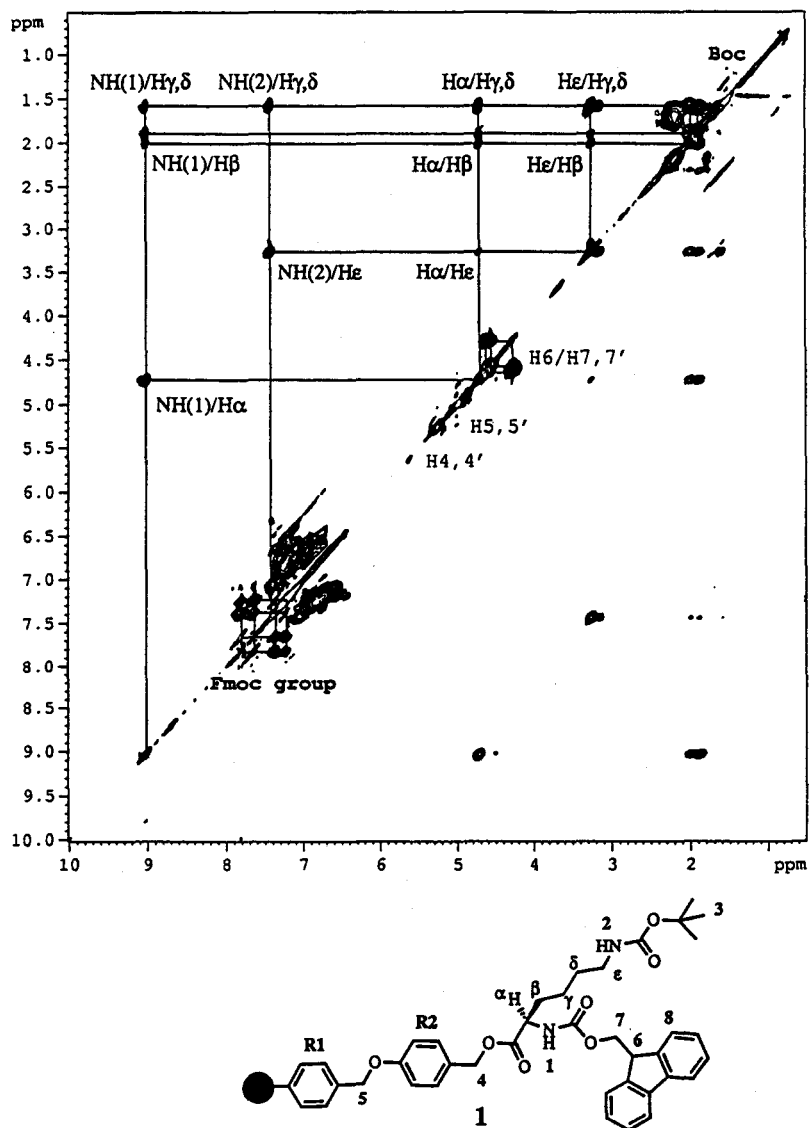


Figure 1. 2D phase sensitive TOCSY spectrum for the Wang-Lys(Boc)-Fmoc resin (1) swollen in the deuterated pyridine, obtained with a 70 ms MLEV-17 mixing sequence and with MAS at 2 kHz.

Attribution of a Molecule Attached to its Bead

Using a conventional 7 mm MAS solid state probe and the above described experimental conditions, 'solution' quality ^1H and ^{13}C NMR data could be collected for the Wang-Lys(Boc)-Fmoc resin (1). TMS was added as internal reference to the deuterated pyridine before the resin swelling, and the ^2H resonance of the solvent was used for the field frequency lock during the homonuclear data collection.

Although a line width of 21 Hz can be considered as broad for high resolution studies, this resolution proved to be entirely satisfactory for the extraction of structural information through two-dimensional NMR spectra. Total ^1H and ^{13}C NMR assignments and structural identification for the Wang-Lys(Boc)-Fmoc resin could readily be obtained using standard TOCSY¹² and ^1H - ^{13}C HMQC¹³ experiments. For the TOCSY experiment, a 70 ms MLEV-17 mixing time was used with a field strength of 10 kHz and appropriated delays to compensate for ROESY effects (clean-TOCSY).¹² The TOCSY and HMQC data were collected as a data matrix of 1024*256 complex points with 16 scans per increment. The total time for each 2D experiments was approximately 3 hours. These results for the deuterated pyridine swollen beads are shown in Figures 1 and 2, but results for the other solvents (except for deuterated DMSO) were comparable. The identification of the ^1H spin system of the protected lysine was unambiguous using the pattern of relayed connectivities in the TOCSY spectrum as described in the Figure 1. The chain can be traced from the backbone amide proton through the α -proton and the different side chain protons up to the ϵ -protons. The reverse pathway from the *tert*-butoxycarbonyl (Boc) protected amide proton through the ϵ -protons and all side chain protons until the α -proton can also be identified. The 9-fluorenylmethoxycarbonyl (Fmoc) proton resonances are characterized by a typical pattern of connectivities in the aromatic region. The H6 and H7 protons connecting the Fmoc group to the Lysine residue were assigned as a group of three interconnected protons, whereas the H4 and H5 protons form isolated proton pairs and could not be unambiguously assigned at this stage.

The carbon assignments follow directly from the previously determined proton assignments and from the observed ^1H - ^{13}C correlation peaks as shown in Figure 2. Complete ^1H and ^{13}C NMR assignments for the Wang-Lys(Boc)-Fmoc resin swollen in the deuterated pyridine are provided in the Table 2. The chemical shift assignment obtained here agrees well with the values obtained by Anderson and al. for the Wang-Lys(Boc)-Fmoc resin.⁵

Whereas the 2 kHz Magic Angle Spinning removes the residual static line broadening caused by the proton dipolar coupling, the dipolar cross-relaxation mechanism is unaffected by this process.¹⁴ Therefore, a NOESY¹⁵ experiment performed with a 600 ms mixing time yielded intense cross peaks between the protons spins of the attached molecules. Figure 3A shows the TOCSY spectrum for the Wang-Lys(Boc)-Fmoc resin swollen in deuterated benzene, which yields results very comparable to those obtained in deuterated pyridine. A part of the corresponding NOESY spectrum is shown in Figure 3B. NOE connectivities between the H6 and H7 proton resonances and the H8 proton resonance of the Fmoc group can be observed. The NOESY spectrum allows further an unambiguous identification of the H4 and H5 resonances. A sharp NOE peak was observed between H4 and two aromatic protons of the ring noted R2, whereas a broad NOE peak was observed between H5 and two aromatic protons of the ring noted R1 which already belongs to the polymer solid support. The line width read from these NOE connectivities is directly correlated to the motional freedom of the protons H4 and H5 in the molecule: H5 is closer to the polymer bead than H4, and presents a broader line width. The difference in line width observed in the ω_1 dimension clearly indicates the mobility gradient for the two aromatic rings R1 and R2: whereas the proton resonances of the R1 ring of the polystyrene bead are large, the presence of the ether linker confers an

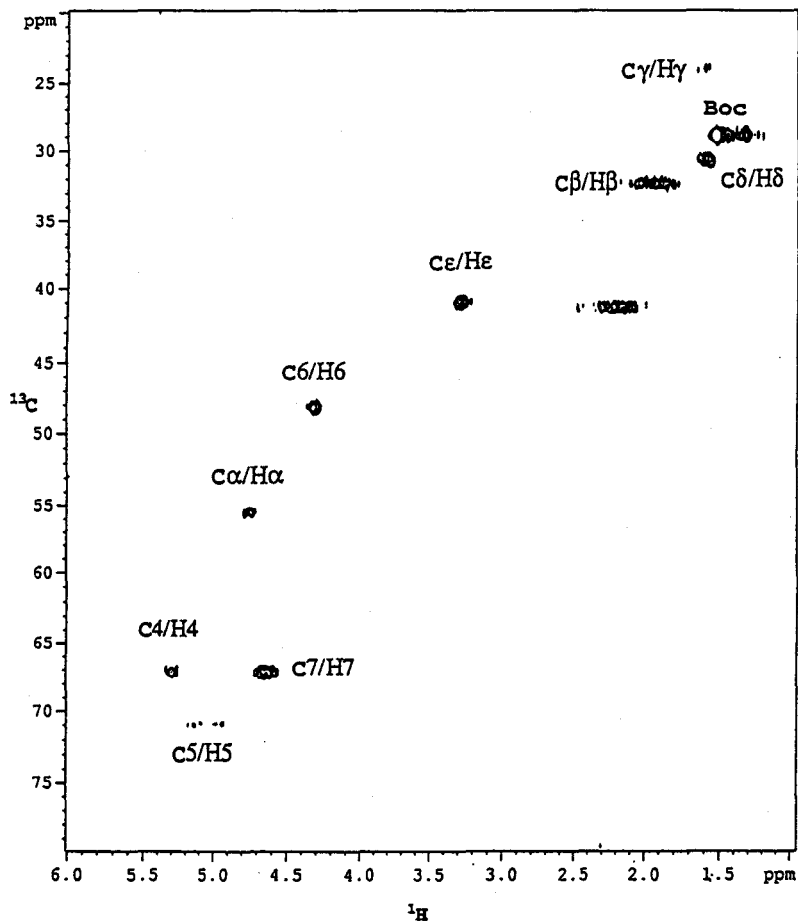


Figure 2. Aliphatic region of the ^1H - ^{13}C HMQC spectrum for the Wang-Lys(Boc)-Fmoc resin (1) swollen in the deuterated pyridine with MAS at 2 kHz.

Table 2. Proton and Carbon-13 assignments for the Wang-Lys(Boc)-Fmoc resin (1) swollen in the deuterated pyridine.

Assignment	Proton shift	Carbon-13 shift
α	4.73	55.26
β	1.89 2.03	32.14
γ	1.59	23.85
δ	1.59	30.31
ϵ	3.26	41.13
NH(1)	9.03	-
NH(2)	7.43	-
Boc	1.53	28.73
4	5.27	66.80
5	5.00	70.46
Fmoc group		
aromatics	7.83, 7.65, 7.34, 7.24	nd
6	4.30	47.89
7	4.57, 4.66	66.80

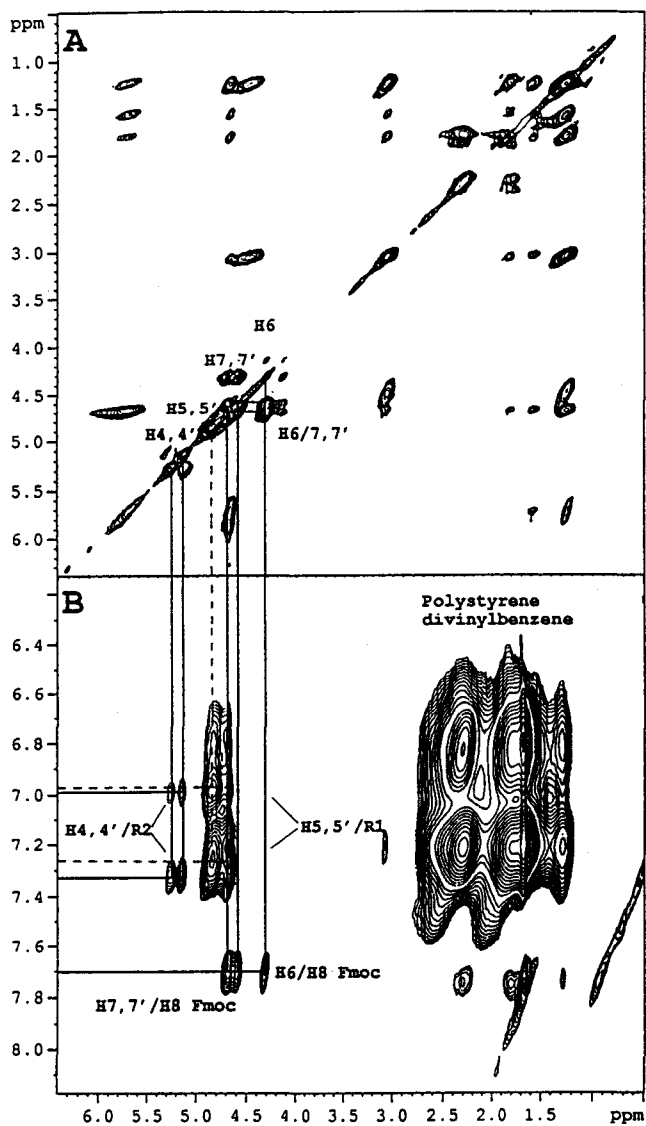


Figure 3. (A) 2D phase sensitive 70 ms TOCSY spectrum for the Wang-Lys(Boc)-Fmoc resin swollen in the deuterated benzene with MAS (2 kHz). (B) 2D phase sensitive NOESY spectrum for the Wang-Lys(Boc)-Fmoc resin (1) swollen in the deuterated benzene, obtained with 600 ms for mixing time under MAS at 2 kHz.

important degree of motional freedom to the R2 ring, resulting in a narrow line width for protons on the latter. In contrast to the TOCSY spectrum, intense and broad connectivities have also been identified between proton spins belonging to the polystyrene in the NOESY spectrum.

Step-by-Step Assignment of a Real-Life Chemical Reaction by MAS NMR.

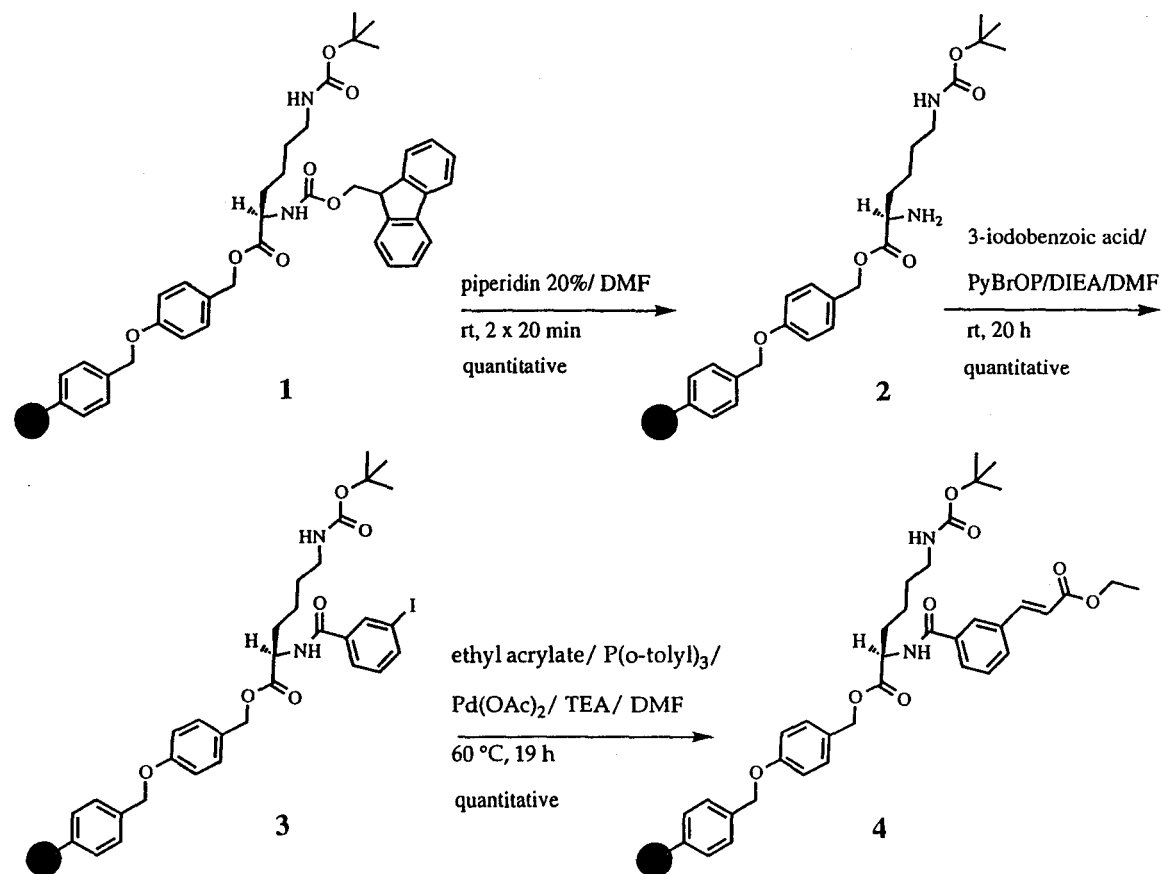
A real challenge in solid phase synthesis is the monitoring of a multi-step chemical reaction. We decided to follow up the Heck reaction. This reaction is a well known process to form carbon-carbon bonds and presents a great interest for the combinatorial solid phase synthesis. It offers the possibility of exploiting a large variety of building blocks, generating disubstituted olefins which are of great interest in combinatorial chemistry. Moreover, the Heck reaction is generally a very mild process, thus being readily amenable to automation. Recently, the formation of carbon-carbon bond in solid phase synthesis using the Heck reaction was reported.^{16,17}

The same Wang-Lys(Boc)-Fmoc resin of the previously described MAS NMR experiments was submitted to a three step synthesis (Scheme 1). First, the Fmoc group was deprotected in the classical manner, using a 20 % solution of piperidin in DMF. Secondly, the 3-iodobenzoic acid was coupled to the liberated αNH_2 group using PyBrOP as activating reagent. The completion of the reaction was determined by quantification of the residual NH_2 on the resin, using the quantitative ninhydrin procedure.¹⁸ An aliquot of the resin was cleaved using a 90 % trifluoroacetic acid (TFA) solution in DCM and the product was analysed in HPLC. Finally, the aryl iodide on the resin was reacted with ethyl acrylate in DMF, in presence of tris(2-tolyl)phosphine, Palladium acetate and triethylamine, under nitrogen at 60 °C, to generate a disubstituted olefin. An aliquot of the final resin was also cleaved using a 90 % TFA solution in DCM and the released product was analysed in HPLC and in solution phase NMR. We thus confirmed the total conversion of the aryl iodide on the resin into the desired olefin.

Each reaction step was followed by MAS NMR TOCSY and HMQC spectra, using the experimental conditions previously determined for the Wang-Lys(Boc)-Fmoc resin. Pyridine was found to be the solvent of choice to swell the polymeric beads for the resins in all the three reaction steps (only TOCSY spectra collected using deuterated pyridine swollen beads are presented). At each reaction step, total structural identification and NMR assignment of the new molecular entity formed on the polymer could be unambiguously obtained on the NMR spectra (Table 3, Figures 4 to 6).

For compound 2, peaks corresponding to the Fmoc protecting group disappeared. In the same time, the shift of the α -proton toward the high field confirms the elimination of the Fmoc moiety which was present in the proximity of the $\text{C}\alpha$ position. The αNH_2 protons have disappeared from the spectrum. This inability to observe amino proton resonances in MAS NMR was previously reported in the case of the NH_3^+ of the L-alanine.¹⁹ It was explained by an interference phenomenon between the molecular dynamics and the characteristic radiofrequency field strength of homonuclear pulse trains employed in the NMR experiments leading to dramatic broadening of lines of amino protons.

For compound 3, peaks that appeared in the aromatic zone of the TOCSY NMR chart could be attributed to the 3-iodobenzoyl group newly attached to the resin. Only three from the four protons belonging to the 3-iodobenzoyl group were detected and we could not identify which peak corresponded to a defined proton. At this step, the important downfield shift noted for the α -proton confirms the presence of the benzoyl ring in the proximity of the $\text{C}\alpha$ position.



Scheme 1. The three step solid phase synthesis followed by MAS NMR.

Table 3. Proton assignments for resins 2, 3 and 4 swollen in the deuterated pyridine.

Assignment	Proton Shift		
	resin 2	resin 3	resin 4
α	3.55	5.11	5.14
β	1.80	1.94, 2.05	1.94, 2.06
γ	1.57	1.56	1.54
δ	1.57	1.56	1.54
ϵ	3.28	3.24	3.25
NH(1)	-	9.64	9.91
NH(2)	7.41	7.45	7.42
3	1.52	1.50	1.49
4	5.22	5.27	5.27
5	5.04	4.95	4.98
R3		8.63, 8.17, 7.76	8.47, 8.23, 7.60, 7.34
9			7.78
10			6.52
11			4.18
12			1.15

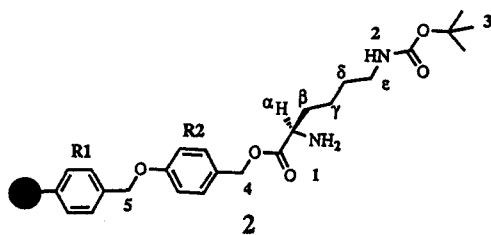
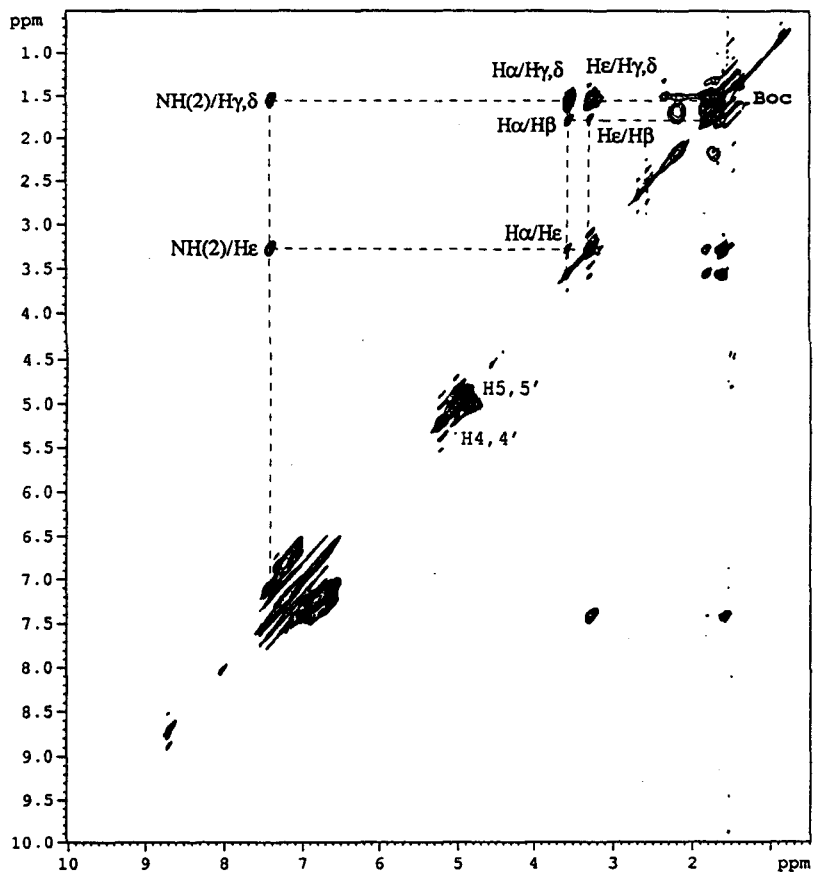


Figure 4. 2D phase sensitive 70 ms TOCSY spectrum for resin 2 swollen in the deuterated pyridine under MAS at 2 kHz.

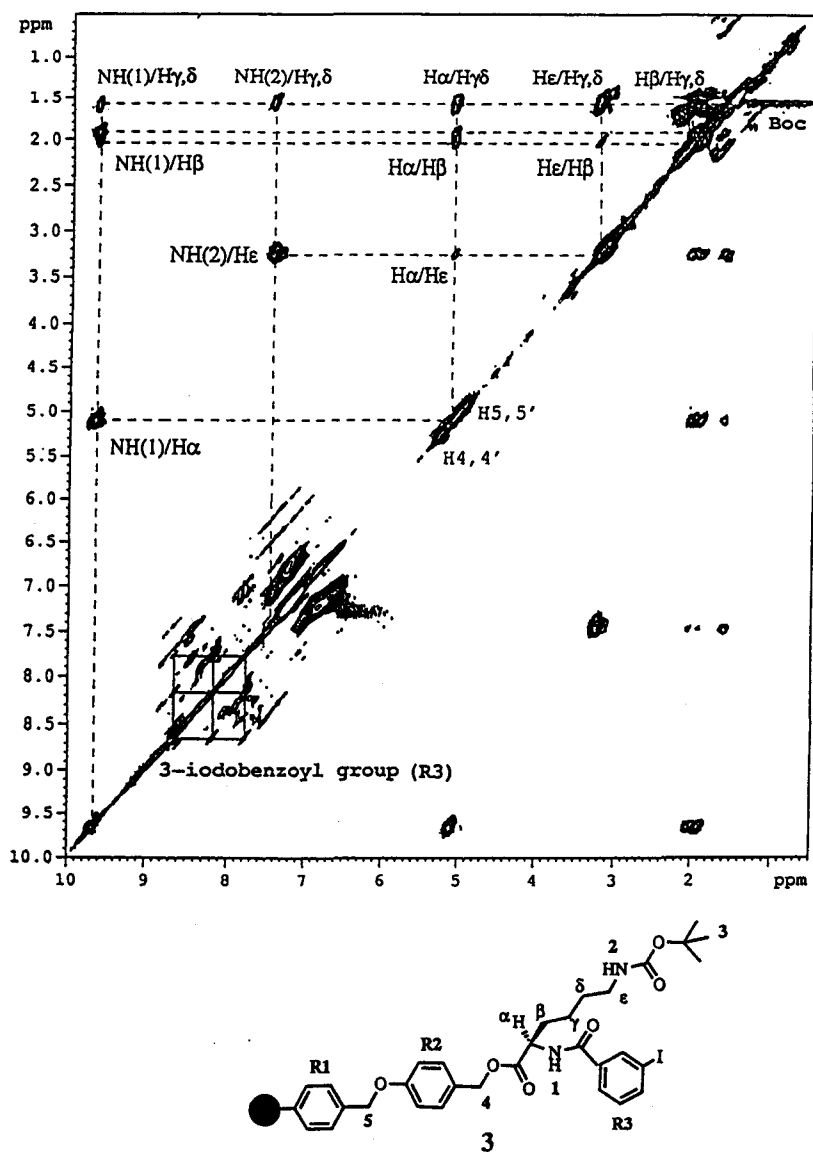


Figure 5. 2D phase sensitive 70 ms TOCSY spectrum for resin 3 swollen in the deuterated pyridine under MAS at 2 kHz.

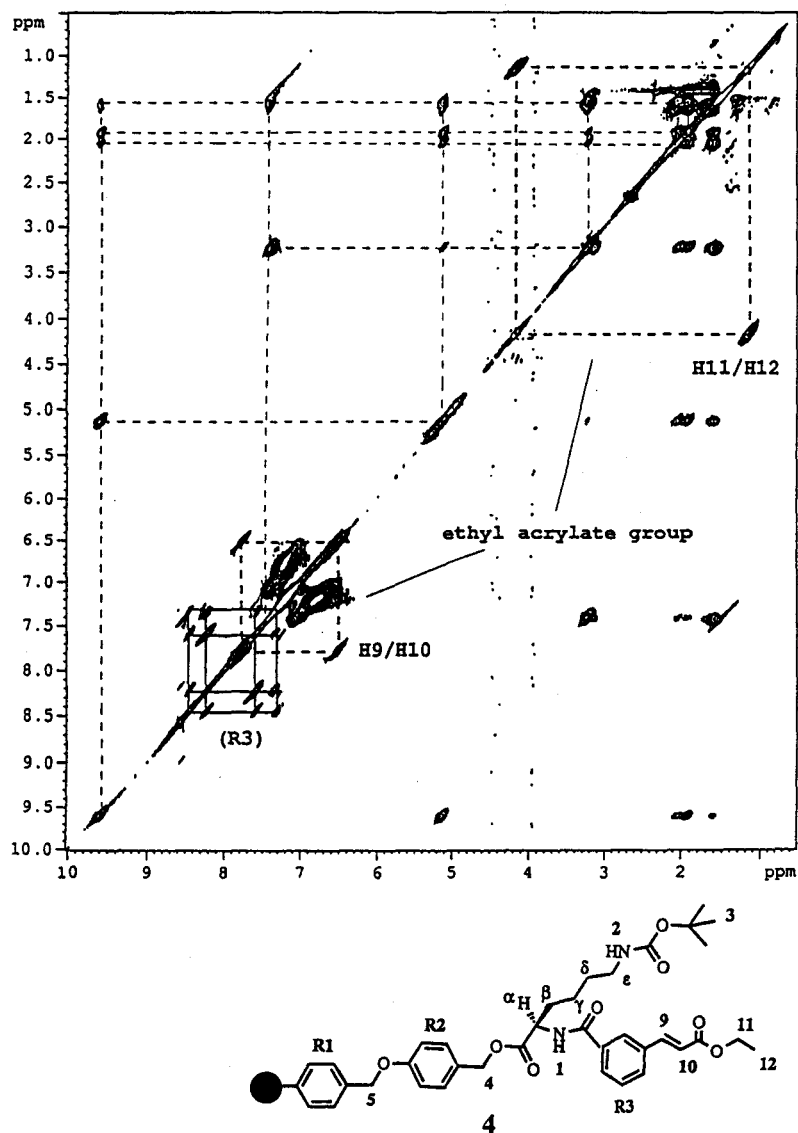


Figure 6. 2D phase sensitive 70 ms TOCSY spectrum for resin 4 swollen in the deuterated pyridine under MAS at 2 kHz.

In compound **4**, apparition on the TOCSY NMR chart of peaks attributed to the ethyl acrylate group confirmed the formation of the trans disubstituted olefin on resin, *via* the Heck reaction. This time, the four protons corresponding to the R3 aromatic ring are much better resolved than in compound **3** but once more we could not identify which peak corresponded to a defined proton.

Conclusions.

The MAS NMR technique was used to follow a real-life multi-step solid phase synthesis, without cleavage of the products from their solid support. At each reaction step, NMR assignment and total structural characterization of the new molecular entity formed on the polymer could be unambiguously obtained. A good swelling of the resin beads and the use of the MAS were found to be essential to obtain spectra of good quality. 'Solution' quality ¹H NMR data could be collected using a conventional 7 mm MAS solid state probe on a Bruker DRX-300 spectrometer.

Acknowledgements.

We thank Dr. P. Lux and Dr. M. Piotto (Bruker Spectrospin France) for the solid MAS probe, and Y. Dumazy (Université des Sciences et Technologies de Lille) for his help in obtaining these data. We are grateful to Prof. J. Jeener and Dr. P. Broekaert (ULB, Brussels, Belgium) for careful reading of the manuscript. C.D. acknowledges receipt of a graduate fellowship cofinanced by Bruker Spectrospin France, and the Région Nord-Pas de Calais (France). The 300 MHz facility used in this study was funded by the Région Nord-Pas de Calais (France), the CNRS and the Institut Pasteur de Lille.

References

1. Lowe, I.J. *Phys. Rev. Lett.* **1959**, *2*, 285
2. Andrew, E. R.; Bradbury, A.; Eades R. G. *Nature* **1958**, *182*, 1659
3. Fitch, W. L.; Detre, G.; Holmes, C. P.; Shooreley, J. N.; Keifer, P. A. *J. Org. Chem.* **1994**, *59*, 7955
4. Anderson, R. C.; Jarema, M. A.; Shapiro, M. J.; Stokes, J. P.; Ziliox, M. *J. Org. Chem.* **1995**, *60*, 2650
5. Anderson, R. C.; Stokes, J. P.; Shapiro, M. J. *Tetrahedron Lett.* **1995**, *36*, 5311
6. Stoll, M. E.; Majors, T.J. *Phys. Rev. B* **1981**, *24*, 2859
7. Manzi, A.; Salimath, P. V.; Spiros, R. C.; Keifer, P.A.; Freeze, H.H. *J. Biol. Chem.* **1995**, *270*, 9154
8. Fuks, L. F.; Huang, F. S. C.; Carter, C. M.; Edelstein, W. A.; Roemer, P. B. *J. Mag. Res.* **1992**, *100*, 229
9. Hoult, D. I.; Richards, R. E.; Styles, P. *J. Mag. Res.* **1978**, *30*, 351
10. Garroay, A. N *J. Mag. Res.* **1982**, *49*, 168
11. Barbara, T. M. *J. Mag. Res. A* **1994**, *109*, 265
12. Bax, A.; Griffey, R.H.; Hawkins, B.L. *J. Mag. Res.* **1983**, *55*, 301
13. Griesinger, C.; Otting, G.; Wüthrich, K.; Ernst, R. R. *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110*, 7870
14. Ganapathy, S.; Rajamohanam, P. R.; Ramanujulu, P. M.; Mandhare, A. B.; Mashelkar, R. A. *Polymer*, **1994**, *35*, 888
15. Kumar, A.; Ernst, R. R.; and Wüthrich, K. (1980) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1980**, *95*, 1
16. Yu, K.-L.; Deshpande, M. S.; Vyas, D. M. *Tetrahedron Lett.* **1994**, *35*, 8919
17. Hiroshige, M.; Hauske, J. R.; Zhou, P. *Tetrahedron Lett.* **1995**, *36*, 4567

18. Sarin, V. K.; Kent, B. H.; Tam, J. P.; Merrifield, R. B. *Analytical Biochem.* **1981**, *117*, 147
19. Long, J. R.; Sun, B. Q.; Bowen, A. ; Griffin, R. G. *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 11950

Reprinted from Conference Proceedings Series
Molecular Diversity and Combinatorial Chemistry
Irwin M. Chaiken and Kim D. Janda, Editors
Published 1996 by the American Chemical Society

1.3 Conclusion et perspectives

Pour le polymère de départ, une Fmoc-(Lysine)-Boc sur résine de Wang, nous avons déterminé les meilleures conditions de solvation de la matrice solide en testant la capacité de différents solvants à gonfler la résine. Suite aux mesures des diamètres moyens des billes gonflées dans différents solvants, la pyridine s'est révélée être le solvant le plus approprié pour le polymère de départ. Ce solvant fut utilisé pour le suivi complet de la synthèse. Pour chacune des trois étapes de la réaction, la très bonne résolution des spectres 1D en ^1H et en ^{13}C et 2D MAS TOCSY (Braunschweiler & Ernst, 1983) et MAS ^1H - ^{13}C HMQC (Bax *et al.*, 1983), nous a permis d'identifier complètement chaque nouvelle entité moléculaire formée sur les billes de résine.

Nous avons ainsi démontré l'entière faisabilité de l'utilisation de la technique RMN MAS pour le suivi direct d'une réaction organique en phase solide, et ceci sans avoir recours à un échantillon isotopiquement marqué en ^{13}C (Sarkar *et al.*, 1996). La technique RMN MAS est une méthode analytique sensible, rapide et non destructrice qui promet d'être très utile pour déterminer la structure de molécules produites par synthèse combinatoire en phase solide.

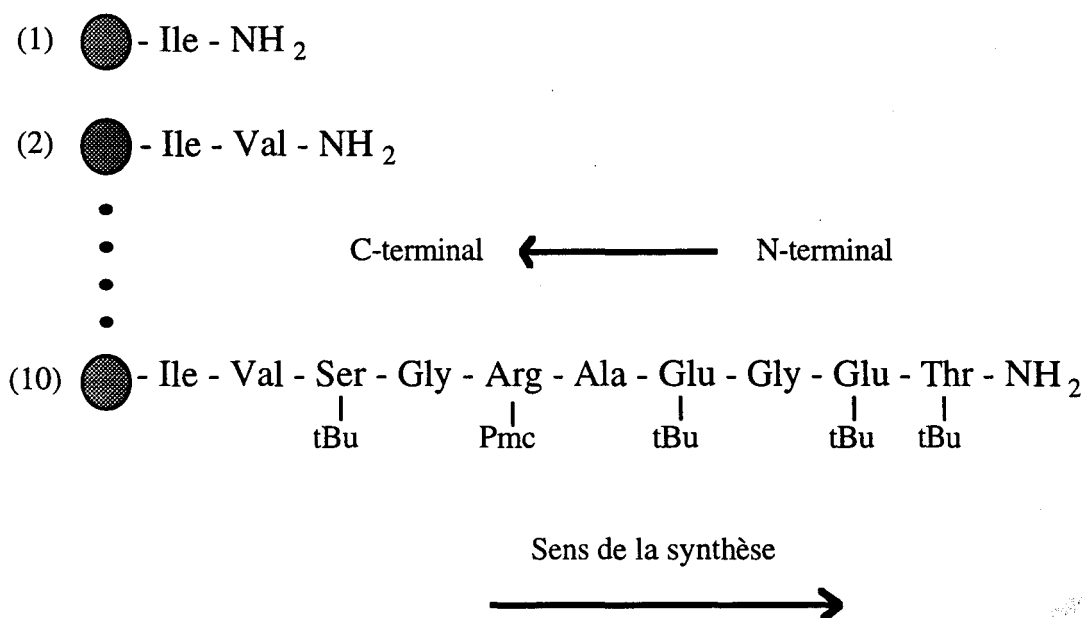
Nous avons ensuite cherché à appliquer la technique RMN MAS dans le domaine de la synthèse peptidique en phase solide, de façon à identifier les causes structurales de l'origine de problèmes apparaissant durant la synthèse de séquences dites "séquences difficiles".

2. Suivi complet de la synthèse peptidique en phase solide d'une "séquence difficile"

2.1 Introduction

Un problème majeur en synthèse peptidique en phase solide réside dans l'existence de séquences appelées "séquences difficiles" (Krchnak *et al.* 1993; VanWoerkom & VanNispen, 1991; Milton *et al.*, 1990). Dans ce type de synthèse, les réactions de couplage et/ou de déprotection s'avèrent incomplètes. Ces problèmes ont souvent été attribués à une structuration et/ou une mauvaise solvataion des chaînes peptidiques en cours de croissance sur le support solide de synthèse (Tam & Lu, 1995; Stewart & Klis, 1990; Deber *et al.*, 1989; Ludwick *et al.*, 1986). Or, du point de vue structural, il existe peu de méthodes analytiques permettant d'étudier ce type de séquences encore ancrées au support de synthèse. Une caractérisation par des techniques telles que l'IR-FT ou la RPE, est lourde car elles nécessitent respectivement l'utilisation de groupes protecteurs marqués au deutérium ou l'incorporation d'un acide aminé paramagnétique.

Nous montrons ici qu'il est possible grâce à la technique RMN MAS de caractériser complètement la synthèse sur support solide d'une séquence peptidique de 10 acides aminés, connue pour être une "séquence difficile" (Simmonds, 1996).



La synthèse ayant été réalisée dans le DMF, nous avons utilisé la forme deutérée de ce solvant pour gonfler la résine en vue de l'analyse RMN MAS. Pour chacune des étapes de la synthèse, la structure primaire complète du peptide en croissance sur la résine a été obtenue en utilisant les données des spectres 1D en ^1H et ^{13}C , et des spectres 2D MAS TOCSY (Braunschweiler & Ernst, 1983) MAS NOESY (Kumar *et al.*, 1980) et MAS ^1H - ^{13}C HMQC (Bax *et al.*, 1983). A partir de l'analyse des contacts NOE et des variations de déplacements chimiques des $\text{H}\alpha$, $\text{C}\alpha$ et $\text{C}\beta$, nous avons déterminé de manière précise la structure secondaire du peptide en cours de croissance sur le support solide. Une structure secondaire de type étendue a été identifiée à partir des contacts NOE forts $\text{NH}(i)\text{-H}\alpha(i+1)$ et de NOEs faibles $\text{NH}(i)\text{-NH}(i+1)$ (Wüthrich, 1986), et confirmée par les indices de déplacements chimiques de Wishart (Wishart *et al.*, 1992, 1995; Wishart & Sykes, 1994).

En utilisant différentes proportions de mélange de solvants aprotiques polaires (DMF / DMSO) pour gonfler la résine, nous avons pu établir aux étapes difficiles de la synthèse, une parfaite corrélation entre les difficultés de couplage et un phénomène d'agrégation des chaînes peptidiques sur la résine. Ceci a été montré par les résultats de RMN MAS, et corrélé par les mesures de diamètre moyens des billes et les mesures de rendement de couplage. L'efficacité d'un solvant accepteur de liaisons hydrogènes tel que le DMSO, a été mise en évidence par une réduction de l'agrégation du peptide sur la résine résultant en une augmentation de la mobilité des chaînes peptidiques, et en une amélioration de la solvation de la peptidyl-résine. De plus, une amélioration de l'accessibilité des groupements amines réactifs du peptide a été mise en évidence par une augmentation des rendements de couplage mesurés aux étapes critiques de la synthèse lorsque le mélange (DMF / DMSO) est utilisé.

2.2 Suivi complet de la synthèse peptidique en phase solide d'une "séquence difficile"

Magic Angle Spinning Nuclear Magnetic Resonance in Solid-Phase Peptide Synthesis

Christophe Dhalluin, Christophe Boutillon, André Tartar,
and Guy Lippens

Contribution from CNRS URA 1309, Institut Pasteur de Lille,
1 rue du Professeur Calmette, 59019 Lille cedex, France,
Faculté de Pharmacie, 3 rue du Professeur Laguesse, 59000 Lille,
France, and CEREP, 1 rue du Professeur Calmette,
59019 Lille cedex, France

JOURNAL
OF THE
AMERICAN
CHEMICAL
SOCIETY®

Reprinted from
Volume 119, Number 43, Pages 10494–10500

Magic Angle Spinning Nuclear Magnetic Resonance in Solid-Phase Peptide Synthesis

Christophe Dhalluin,[†] Christophe Boutillon,^{†‡} André Tartar,[§] and Guy Lippens^{*†}

Contribution from CNRS URA 1309, Institut Pasteur de Lille, 1 rue du Professeur Calmette, 59019 Lille cedex, France, Faculté de Pharmacie, 3 rue du Professeur Laguesse, 59000 Lille, France, and CEREP, 1 rue du Professeur Calmette, 59019 Lille cedex, France

Received June 2, 1997. Revised Manuscript Received August 14, 1997[Ⓞ]

Abstract: Solid-phase peptide synthesis of certain sequences (commonly called “difficult sequences”) suffers from the occurrence of incomplete coupling reactions and/or partial unmaskings of N^α-protection. The underlying reasons for these problems are thought to be a structuration and/or a poor solvation of the growing peptide chains. Few methods are available to study the structural aspects of the peptide chains when still anchored to the solid support. In most cases, they rely on the incorporation of a specific label and examine therefore a modified peptide analog. We describe the complete characterization by homonuclear and heteronuclear magic angle spinning nuclear magnetic resonance (MAS NMR) of the solid-phase synthesis of a 10-residue peptide. A detailed secondary structure determination of the growing peptide on the resin beads, based on the NOE analysis and the ¹H and ¹³C chemical shift deviations, indicated an extended structure on the whole length of the sequence. At critical synthesis steps, a correlation between the coupling difficulties and the aggregation of the peptide chains was established by chemical measurements and MAS NMR. Upon titration with the hydrogen bond-accepting solvent DMSO, the mobility of the peptide chains on the resin beads increased, resulting in a significant line narrowing of the MAS NMR spectra. This increased mobility is linked to an enhanced peptidyl-resin solvation as reflected by the better coupling efficiency at the critical synthesis steps.

Introduction

Since the introduction of stepwise solid-phase peptide synthesis by Merrifield in 1963,¹ this method has developed into a powerful tool for the preparation of a great number of important biological polypeptides.^{2,3} However it has been frequently reported that side products occur during solid-phase peptide synthesis.⁴ The N^α-deprotection and, more frequently, the acylation stages, for example, can be highly inhibited or even totally prevented at some stage of the synthesis, leading to deleted or truncated sequences. Peptide sequences which display this behavior are commonly called “difficult sequences”.^{5,6} These difficulties in the peptide elongation have often been attributed to a sequence dependent tendency of the growing peptide chains to aggregate through the formation of secondary structures.⁷ The driving force for these inter- or intrachain associations is generally admitted to be hydrogen-bonding^{8,9} and/or apolar interactions between side-chain protect-

ing groups.¹⁰ As this phenomenon clearly influences the yields of peptide syntheses,¹¹ insights at the molecular level of the peptide during its elongation while still linked to the solid support might suggest ways to overcome the synthesis difficulties.

Whereas numerous methods have been developed to quantify the final efficiency of the coupling and deprotection steps, very few methods allow direct access to the structural features of the growing peptide chain on the resin. Among them, the near-infrared Fourier transform (IR-FT) spectroscopy allows to evaluate the efficiency of deprotection reactions as the peptide chain is being elongated.¹² However efficient identification of specific groups requires the incorporation of a deuterium source into the protecting group. In a recent report, electron paramagnetic resonance (EPR) spectroscopy was used to study aggregation problems of peptides on resin beads, but a major problem is the need to include a paramagnetic amino acid in the sequence.¹³ The ¹³C gel-phase NMR spectroscopy on resin-bound material is a reliable technique to determine the success or failure of chemical transformations.¹⁴ A drawback of the method is the low sensitivity inherently linked to 1% natural abundance of ¹³C and to the small amount of compound attached to the resin. Consequently it can take several hours to acquire a spectrum with a suitable signal to noise ratio. The applicability of NMR spectroscopy to resin-supported material was recently extended through the combination of efficient swelling conditions and magic angle spinning (MAS)¹⁵ techniques.^{16–18}

(10) Fields, G. B.; Fields, C. G. *J. Am. Chem. Soc.* 1991, 113, 4202–4207.

(11) Kent, S. B.; Alewood, D.; Alewood, P.; Baca, H.; Jones, A.; Schnölzen, M. In *Innovation and Perspectives in Solid Phase Synthesis*; Epton, R., Ed.; Intercept Ltd.: Andover, U.K., 1992; pp 1–22.

(12) (a) Larsen, B. D.; Christensen, D. H.; Holm, A.; Zillmer, R.; Nielsen, O. F. *J. Am. Chem. Soc.* 1993, 115, 6247–6253. (b) Russell, K.; Cole, D. C.; McLaren, F. M.; Pivonka, D. E. *J. Am. Chem. Soc.* 1996, 118, 7941–7945.

(13) Cilli, E. M.; Marchetto, R.; Schreider, S.; Nakaie, C. R. *Tetrahedron Lett.* 1997, 38, 517–520.

(14) (a) Giralt, E.; Rico, J.; Pedrosa, E. *Tetrahedron* 1984, 40, 4141–4152. (b) Look, G. C.; Holmes, C. P.; Chinn, J. P.; Gallop, M. A. *J. Org. Chem.* 1994, 59, 7588–7590.

* To whom correspondence should be addressed. Tel: 33 (0)3 2087 1229. Fax: 33 (0)3 2087 1233. E-mail: guy@calmette.pasteur-lille.fr.

[†] CNRS URS 1309.

[‡] Faculté de Pharmacie.

[§] CEREP.

[Ⓞ] Abstract published in *Advance ACS Abstracts*, October 1, 1997.

(1) Merrifield, R. B. *J. Am. Chem. Soc.* 1963, 85, 2149–2154.

(2) Merrifield, R. B. *Science* 1986, 232, 341–347.

(3) (a) Gutte, B.; Merrifield, R. B. *J. Biol. Chem.* 1971, 246, 1922–1941. (b) Clark-Lewis, I.; Aebersold, R.; Ziltener, H.; Schrader, J. W.; Hood, L. E.; Kent, S. B. H. *Science* 1986, 231, 134–139. (c) Milton, R. C. L.; Milton, S. C. F.; Kent, S. B. H. *Science* 1992, 256, 1445–1448.

(4) Kent, S. B. H. *Annu. Rev. Biochem.* 1988, 57, 957–989.

(5) Milton, R. C. L.; Milton, S. C. F.; Adams, P. A. *J. Am. Chem. Soc.* 1990, 112, 6039–6046.

(6) (a) Krchnak, V.; Flegelova, Z.; Vagner, J. *Int. J. Pept. Protein Res.* 1993, 42, 450–454. (b) Van Woerkom, W. J.; Van Nispen, J. W. *Int. J. Pept. Protein Res.* 1991, 38, 103–113.

(7) Stewart, J. M.; Klis, W. A. In *Innovation and Perspectives in Solid Phase Synthesis. Peptides, Polypeptides, and Oligonucleotides*; Epton, R., Ed.; SPC Ltd.: Birmingham, U.K., 1990; pp 1–9.

(8) (a) Deber, C. M.; Lutek, M. K.; Heimer, E. P.; Felix, A. M. *Pept. Res.* 1989, 2, 184–188. (b) Ludwick, A. G.; Jelinski, L. W.; Live, D.; Kintanar, A.; Dumais, J. J. *J. Am. Chem. Soc.* 1986, 108, 6493–6496.

(9) Tam, J. P.; Lu, Y. A. *J. Am. Chem. Soc.* 1995, 117, 12058–12063.

Whereas the former confer a high degree of mobility to the attached molecules, the MAS efficiency averages out the inherent magnetic susceptibility differences over the heterogeneous sample making a detection of the proton signals feasible.^{19,20} This alleviates the sensitivity problems of ¹³C NMR and makes the classical techniques of 2D NMR readily available. The MAS NMR technique is therefore a sensitive and non-destructive analytical method to completely characterize molecules covalently anchored to the solid support.

We report here the MAS NMR characterization of the solid-phase peptide synthesis of a well-established difficult sequence formed by the 10-residue peptide NH₂-Thr-Glu-Gly-Glu-Ala-Arg-Gly-Ser-Val-Ile-OH.²¹ First we report the NMR assignment of our model peptide during its elongation on resin beads. We complete the assignment by a detailed secondary structure determination based on the NOE analysis and the ¹H and ¹³C chemical shift deviations. We also examine at critical synthesis steps the influence of the swelling solvent on the success of the synthesis, by both structural and chemical characterization of the peptide elongation in various aprotic polar solvent mixtures. Finally these results allow us to identify the limiting factors for the synthesis of the difficult sequence.

Experimental Procedures

Solid-Phase Peptide Synthesis. The sequence selected as a difficult sequence model was the Aggrecan (a human cartilage large aggregating proteoglycan) residues 370–379 (NH₂-Thr-Glu-Gly-Glu-Ala-Arg-Gly-Ser-Val-Ile-OH), which were initially required as a model substrate for aggrecanase that cleaves Aggrecan at the Glu³⁷³-Ala³⁷⁴ peptide bond.²¹ This sequence was manually synthesized according to the solid-phase method using the Fmoc/*t*-Bu strategy, starting with 1.37 g (1 mmol) of Fmoc-Ile-Wang-resin (0.730 mmol/g). Side chain protecting groups were as follows: Ser(*Or*-Bu), Arg(Pmc), Glu(*Or*-Bu), and Thr(*Or*-Bu). The Fmoc deprotection steps were performed twice with 20% (v/v) piperidine in *N,N*-dimethylformamide (DMF) for 15 min each. Double couplings were systematically performed with 4-fold excess of activated amino acids (4 mmol) using 2-(1*H*-benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium (HBTU) and 1-hydroxybenzotriazole (HOBt) in the presence of *N,N*-diisopropylethylamine (DIEA) (4 mmol:4 mmol:8 mmol) in DMF for 45 min each. All these compounds were previously incubated together for 2 min before transfer to the reaction vessel. Coupling and deprotection steps were monitored by ninhydrin tests.²² A third coupling was carried out for the couplings of Ala³⁷⁴

on Arg³⁷⁵, Glu³⁷³ on Ala³⁷⁴, and Thr³⁷⁰ on Glu³⁷¹. At the end of each cycle, a capping step of unreacted free amino groups was performed with 10% (v/v) acetic anhydride, 5% (v/v) DIEA in CH₂Cl₂ for 10 min. One aliquot of 100 mg of peptidyl-resin was removed at the end of each synthesis step and submitted twice to 20% (v/v) piperidine in DMF for 15 min each to deprotect the amino terminal function. In this manner, the first sample contained one amino acid on the resin, the second contained two, ..., up to the tenth sample which contained the complete anchored peptide, protected on its side chains. Two additional samples were also analyzed: the 5-residue sample with its N-terminal extremity protected with a Fmoc group and the same sample acetylated on its N-terminal extremity, after cleavage of the Fmoc group.

MAS NMR Experiments. At each synthesis step and after N-terminal Fmoc deprotection, 10 mg of resin-supported peptide was taken for MAS NMR analyses. As throughout the synthesis DMF was used as the solvent for deprotection and coupling steps, the NMR analyses were equally carried out with DMF. The peptidyl-resins were swollen with a minimal volume of deuterated DMF (DMF-*d*₇) before introducing them into a full 4 mm MAS rotor. The solvent mixture titration was performed using deuterated dimethyl sulfoxide (DMSO-*d*₆). Tetramethylsilane (TMS) was added as internal reference to the solvent before the resin swelling. Theoretical and experimental aspects of the MAS NMR technique applied for the characterization of resin-supported molecules have been previously described in detail.²⁰ All NMR experiments were performed at room temperature on a Bruker DRX 300 MHz spectrometer equipped with a 4 mm high-resolution solid-state MAS probe. A spinning of 4 kHz was sufficient to obtain line narrowing and to avoid spinning side bands in the ¹H NMR spectra. TOCSY²³ spectra were acquired with 70 ms 10 kHz MLEV-17 spin-lock field strength. NOESY²⁴ spectra were acquired with a 150 ms mixing period. Both spectra consisted of 2048 complex points in *t*₂ and 256 complex *t*₁ increments with 16 scans/increment utilizing the States method²⁵ to achieve phase discrimination in ω_1 . The ¹H-¹³C HMQC²⁶ spectra were obtained using the same procedure with 32 scans/increment.

Bead Diameter Measurement. To study the effect of the solvent composition on the bead size of the 9- and 10-residue samples, the bead mean diameters have been measured with the peptidyl amino terminal function in deprotected form under a light microscope (ocular $\times 10$; objective $\times 50$) on a population of 250 beads/solvation condition. Beads, preswollen overnight in DMF or in different mixtures of DMF/DMSO, were spread over a slide with a coverglass to minimize solvent evaporation. A graduated ocular was used for the measurements and was calibrated with the help of a calibrated micrometric ruler printed on a slide.

Coupling Yield Evaluation. The coupling yields under two conditions were measured for the 9-residue sample (Fmoc-Thr(*Or*-Bu) coupled to the peptidyl-resin) and the 10-residue sample (Fmoc-Ile coupled to the peptidyl-resin), according to two different conditions in DMF and DMF/DMSO solvent mixtures. First, 1 equiv of activated amino acids (in comparison to the theoretical loading) was used with HBTU (1 equiv) and HOBt (1 equiv) in the presence of DIEA (2 equiv) in each solvent for 20 min. Peptidyl-resin was pre-equilibrated with the solvent mixture for 1 h before the coupling. The yield of the reactions was measured by the colorimetric picric acid test.²⁷ Second, we used 4 equiv of activated amino acids (in comparison to the theoretical loading) with HBTU (4 equiv) and HOBt (4 equiv) in the presence of DIEA (8 equiv) in each solvent for 45 min. Peptidyl-resin was pre-equilibrated with the solvent mixture for 1 h before the coupling. Here, the yield of the reaction was measured by the colorimetric quantitative ninhydrin reaction.²² The theoretical loadings of the 9- and 10-residue samples before coupling were respectively 0.386 and 0.364 mmol/g.

(15) (a) Andrew, E. R.; Bradbury, A.; Eades, R. G. *Nature* **1959**, *183*, 1802–1803. (b) Lowe, I. J. *Phys. Rev. Lett.* **1959**, *2*, 285–287.

(16) (a) Fitch, W. L.; Detre, G.; Holmes, C. P.; Shoorley, J. N.; Keifer, P. A. *J. Org. Chem.* **1994**, *59*, 7955–7956. (b) Anderson, R. C.; Stokes, J. P.; Shapiro, M. J. *Tetrahedron Lett.* **1995**, *36*, 5311–5314. (c) Anderson, R. C.; Jarema, M. A.; Shapiro, M. J.; Stokes, J. P.; Ziliox, M. J. *J. Org. Chem.* **1995**, *60*, 2650–2651. (d) Garigipati, R. S.; Adams, B.; Adams, J. L.; Sarkar, S. K. *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 2911–2914. (e) Maas, W. E.; Laukien, F. H.; Cory, D. G. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 13085–13086. (f) Sarkar, S. K.; Garigipati, R. S.; Adams, J. L.; Keifer, P. A. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 2305–2306. (g) Keifer, P. A.; Baltusis, L.; Rice, D. M.; Tymiak, A. A.; Shoolery, J. N. *J. Magn. Reson. A* **1996**, *119*, 65–75. (h) Wehler, T.; Westman, J. *Tetrahedron Lett.* **1996**, *37*, 4771–4774. (i) Shapiro, M. J.; Chin, J.; Marti, R. E.; Jarosinski, M. A. *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38*, 1333–1336. (j) Jelinek, R.; Valente, A. P.; Valentine, K. G.; Opella, S. J. *J. Magn. Reson.* **1997**, *125*, 185–187.

(17) Pop, I.; Dhalluin, C.; Déprez, B.; Melnyk, P.; Lippens, G.; Tartar, A. *Tetrahedron* **1996**, *52*, 12209–12222.

(18) Keifer, P. A. *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 1558–1599.

(19) Stoll, M. E.; Majors, T. J. *Phys. Rev. B* **1981**, *24*, 2859–2862.

(20) Dhalluin, C.; Pop, I.; Déprez, B.; Melnyk, P.; Lippens, G.; Tartar, A. In *Conference Proceedings Series Molecular Diversity and Combinatorial Chemistry: Libraries and Drug Discovery*; Chaiken, I. M., Janda, K. D., Eds.; American Chemical Society: Washington, DC, 1996; pp 255–272.

(21) (a) Simmonds, R. G. *Int. J. Pept. Protein Res.* **1996**, *47*, 36–41. (b) Lohmander, S.; Neame, P. J.; Sandy, J. D. *Arthritis Rheum.* **1993**, *36*, 1214–1222.

(22) Sarin, V. K.; Kent, S. B. H.; Tam, J. P.; Merrifield, R. B. *Anal. Biochem.* **1981**, *117*, 147–157.

(23) Braunschweiler, L.; Ernst, R. R. *J. Magn. Reson.* **1983**, *53*, 521–528.

(24) Kumar, A.; Ernst, R. R.; Wüthrich, K. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1980**, *95*, 1–6.

(25) States, D. J.; Haberkorn, R. A.; Ruben, D. J. *J. Magn. Reson.* **1982**, *48*, 286–292.

(26) Bax, A.; Griffey, R. H.; Hawkins, B. L. *J. Magn. Reson.* **1983**, *55*, 301–315.

(27) Arad, O.; Houghten, R. A. *Pept. Res.* **1990**, *3*, 42–50.

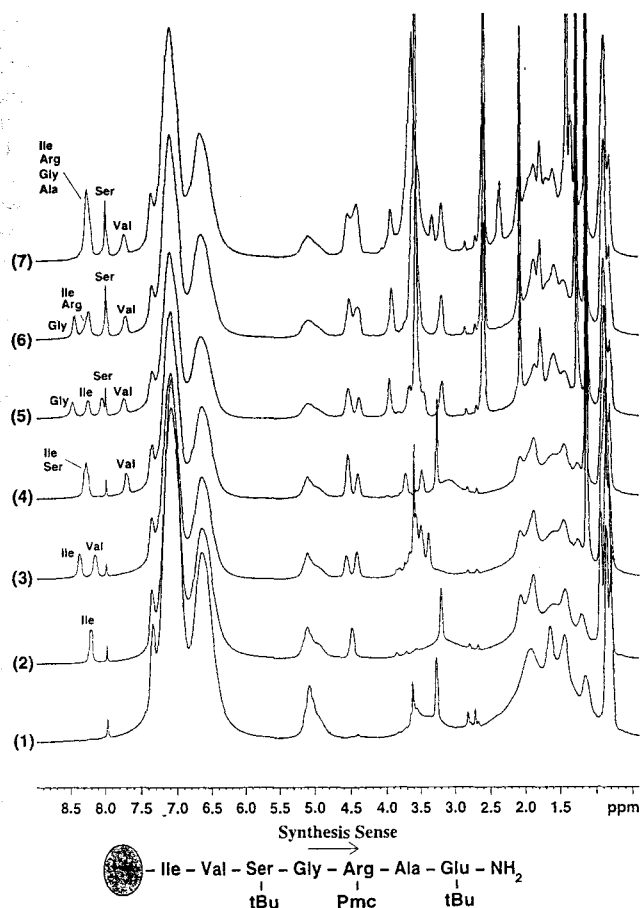


Figure 1. ^1H 1D MAS spectra for the first seven peptidyl-resins swollen in $\text{DMF-}d_7$ at room temperature and 4 kHz spinning rate. The assignment of the NH resonances at each synthesis step is shown.

Results

NMR Assignment. As previously shown, correct swelling of the resin beads is a prerequisite to obtain workable spectra.^{17,18} In DMF, the peptidyl-resin swelling was satisfactory, and the MAS NMR technique allowed us to obtain high-resolution NMR data for resin-supported peptides (Figure 1). The ^1H sequential assignment of each peptide was performed according to the method described by Wüthrich²⁸ using the MAS TOCSY and MAS NOESY spectra. All residues displayed good TOCSY patterns, from both the backbone amide and H_α protons to the side-chains protons. By combining the information provided by the MAS TOCSY and MAS NOESY spectra in the fingerprint region, the ^1H sequential assignment for resin-supported peptides became straightforward. The ^1H spin system of the *t*-Bu and Pmc protecting groups could also be identified. The ^1H assignment is illustrated in Figure 2 with the MAS TOCSY spectrum of the 5-residue peptidyl-resin.

The full assignment of the peptides was completed with the attribution of the carbon resonances based on the ^1H - ^{13}C MAS HMQC experiments (Figure 3). This analysis, analogous to the resonance strategy for a peptide in solution, readily shows the power of the MAS NMR. Whereas the results were also comparable to solution data, one highly unusual ^1H chemical shift was observed at each synthesis step: the H_α resonance of the last coupled residue presented systematically an important upfield shift to 3.30 ppm. At the following coupling step, the H_α resonance of this residue returned to its usual value for H_α resonance in peptides (4.50 ppm), whereas now the anomalous

(28) Wüthrich, K. *NMR of Proteins and Nucleic Acids*; John Wiley and Sons: New York, 1986.

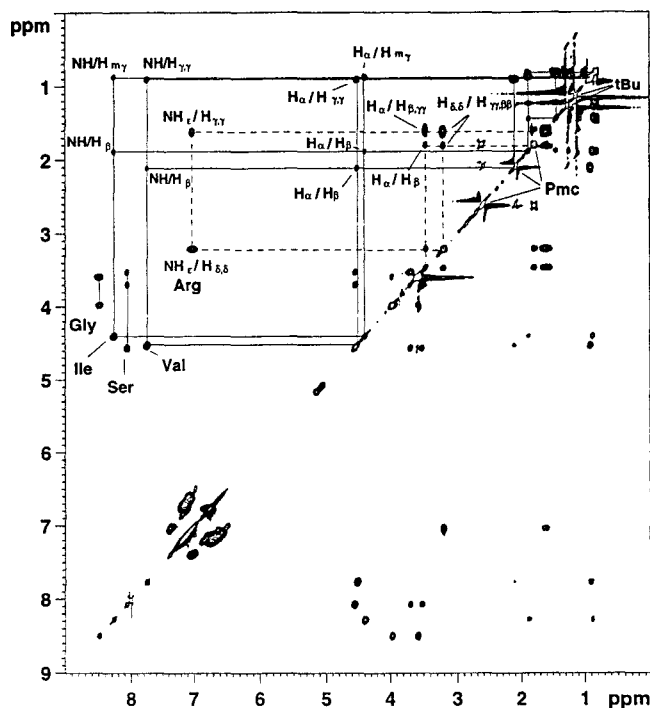


Figure 2. 2D MAS (4 kHz) TOCSY (70 ms) spectrum for the 5-residue peptidyl-resin (resin-Ile¹⁰-Val⁹-Ser⁸(*Or*-Bu)-Gly⁷-Arg⁶(Pmc)-NH₂) swollen in $\text{DMF-}d_7$. The full assignment of the peptide and its side-chain protection is shown.

chemical shift is observed for the residue that is just coupled. This phenomenon was only observed for peptides with a free amino group and disappeared when the N-terminal extremity of the peptide on resin was acetylated or Fmoc protected (data not shown). In Figure 3, we demonstrate this observation for the 5- and 7-residue peptides: the H_α resonances of Arg⁶ and Glu⁴ in the 5- and 7-residue peptidyl-resins, respectively, are located at 3.30 ppm, whereas the H_α resonance of Arg⁶ in the 7-residue peptidyl-resin has returned to its standard value of 4.45 ppm. At the ninth and tenth steps, the assignment of the resin-supported peptides became impossible because of excessively broad ^1H resonances (see below).

Secondary Structure. The secondary structure of the peptides on resin was determined by a qualitative analysis of the NOE peaks. The results are in agreement with an extended structure throughout the peptide chains, characterized by strong and medium sequential NH- H_α NOEs and by weak sequential NH-NH NOEs (Figure 4a-c). The absence of medium and long range ^1H - ^1H distances does reinforce the model of an extended structure over the whole length of the peptide sequence.

Because spin diffusion effects can possibly distort the information of the observed NOE pattern, we completed the secondary structure analysis by the method of chemical shift indices (CSI) proposed by Wishart²⁹ for peptides and proteins in aqueous solution. This method, independent of the NOE information and therefore of spin diffusion, uses the deviation of the chemical shifts of the H_α , C_α , C_β , and carbonyl nuclei from their random coil values as an indication of the secondary structure. The CSI method is a two-stage digital filtration process. In the first stage, a chemical shift index (a ternary index having values -1, 0, and 1) is assigned to all identifiable residues on the basis of their H_α , C_α , C_β , and carbonyl chemical

(29) (a) Wishart, D. S.; Sykes, B. D.; Richards, F. M. *Biochemistry* **1992**, *31*, 1647-1651. (b) Wishart, D. S.; Sykes, B. D. *J. Biomol. NMR* **1994**, *4*, 171-180. (c) Wishart, D. S.; Bigam, C. G.; Holm, A.; Hodges, R. S.; Sykes, B. D. *J. Biomol. NMR* **1995**, *5*, 67-81.

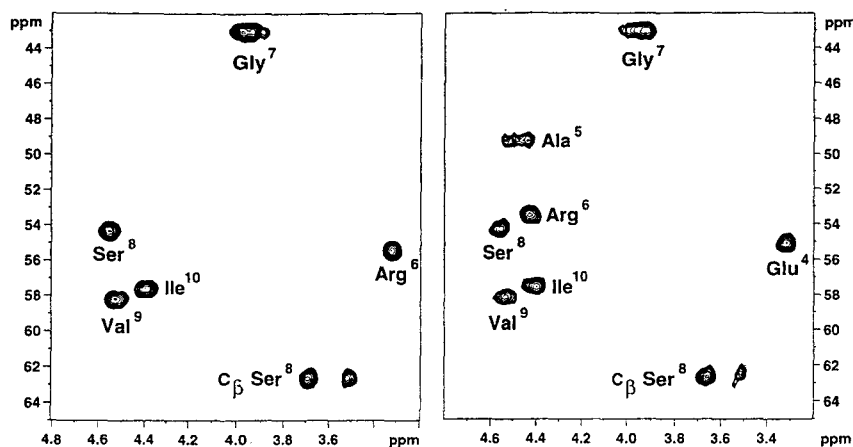


Figure 3. $^{13}\text{C}\alpha\text{--}^1\text{H}\alpha$ domain of the MAS (4 kHz) HMQC spectra for the 5-residue (left) and 7-residue (right) peptidyl-resins swollen in DMF- d_7 . Notice that the $\text{H}\alpha$ chemical shifts of the last coupled residues (Arg⁶ and Glu⁴) in the 5-residue (resin-Ile¹⁰-Val⁹-Ser⁸(Or-Bu)-Gly⁷-Arg⁶(Pmc)-NH₂) and 7-residue (resin-Ile¹⁰-Val⁹-Ser⁸(Or-Bu)-Gly⁷-Arg⁶(Pmc)-Ala⁵-Glu⁴(Or-Bu)-NH₂) peptidyl-resins, respectively, are located at 3.30 ppm.

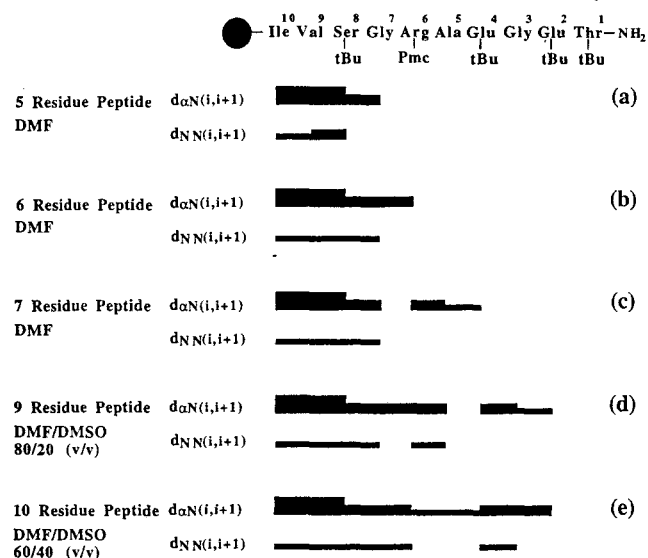


Figure 4. Summary of sequential NOEs for the 5- (a), 6- (b), and 7- (c) residue peptidyl-resins swollen in DMF- d_7 and for the 9- (d) and 10- (e) residue peptidyl-resins swollen in a solvent mixture of DMF- d_7 /DMSO- d_6 (80/20, v/v) and DMF- d_7 /DMSO- d_6 (60/40, v/v) respectively.

shift values. In the second stage, secondary structures are delineated and subsequently identified on the basis of the values and "densities" of these chemical shift indices. This method was applied using the $\text{H}\alpha$, $\text{C}\alpha$, and $\text{C}\beta$ chemical shifts (Figure 5a,b). The main chemical shift deviations were identified for the ^{13}C shifts: we observed a local density of consecutive -1 's and $+1$'s for the $\text{C}\alpha$ and $\text{C}\beta$ indices, respectively, significant of an extended structure. Good agreement exists between the secondary structure predicted by the NOE analysis and the one derived from the CSI method. Whereas the applicability of the latter method is potentially hampered by the absence of random coil chemical shifts for resin-bound amino acids in organic solvents, the good agreement with the NOE data supports the model of an extended structure for the peptide. It should be noted that for peptides in the solid state, a similar approach of conformational classification in α -helices and β -sheets has been proposed based on ^{13}C chemical shift displacements.³⁰ Further efforts of our laboratory will go toward establishing a database of chemical shift values for resin-bound amino acids in a random coil conformation.

(30) (a) Saito, H. *Magn. Reson. Chem.* 1986, 24, 835–852. (b) Heller, H.; Kolbert, A.; Larsen, R.; Ernst, M.; Bekker, T.; Baldwin, M.; Prusiner, S.; Pines, A.; Wemmer, D. *Protein Sci.* 1996, 5, 1655–1661.

NMR Analysis of 9- and 10-Residue Peptidyl-Resins.

Upon using the same experimental strategy for the 9- and 10-residue peptidyl-resins—combining swelling of the resin beads in DMF with MAS NMR spectroscopy—we ran into problems due to increased ^1H line widths. We have previously shown that adequate swelling conditions are absolutely crucial for obtaining high-quality spectra and that the most relevant parameter to evaluate the swelling is the diameter of the individual beads.¹⁷ We therefore have first studied the effect of the solvent composition on the bead size of the 9- and 10-residue peptidyl-resins as a macroscopic parameter indicative of the space volume available to the peptide chains. The bead mean diameter of the 9- and 10-residue peptidyl-resins increases significantly upon the incorporation of DMSO into the swelling solvent (Table 1A). For the 10-residue peptidyl-resin an optimum is reached for 40% DMSO, whereas the beads tend to shrink again upon further addition of DMSO (Table 1B).

For the 9-residue peptidyl-resin, addition of 20% DMSO to the DMF (v/v) improved the spectral quality to some extent (data not shown). For the 10-residue peptidyl-resin the use of DMSO proved to be highly critical for the NMR analysis (Figure 6). In DMF the ^1H NMR spectrum displayed a broad resonance envelope, attributed to decreased local motions of the peptide chain. Increasing amounts of DMSO led to sharper line widths with an optimal result (average line width of 20 Hz) for a 40% DMSO versus DMF (v/v) solvent mixture. At this ratio 2D spectra could also be obtained for the 10-residue peptidyl-resin (Figure 7) and led to a full ^1H sequential assignment. When we further increased the DMSO concentration the spectral quality was again degraded, indicating an optimal solvation and mobility at a 60%/40% DMF/DMSO solvent mixture.

Influence of the Solvent Composition on the Coupling Yield at Critical Synthesis Steps.

The above results indicate a clear relationship between solvent condition and NMR spectral quality. As the line width is directly related to chain mobility, and as the lack of mobility due to aggregation is a potential source of synthesis problems, we have evaluated the chemical yield in the same DMF/DMSO solvent mixtures as used for the NMR analysis. Two different synthesis conditions were chosen. The first condition corresponded to a low coupling yield, chosen to amplify any existing difference in yield. The colorimetric picric acid test was used to evaluate the coupling efficiency. The second condition corresponded to actual conditions of synthesis, where only yields superior to 98%, as measured by the quantitative ninhydrin reaction, were considered as satisfactory. Fmoc-Thr with a *t*-Bu as side-chain protection

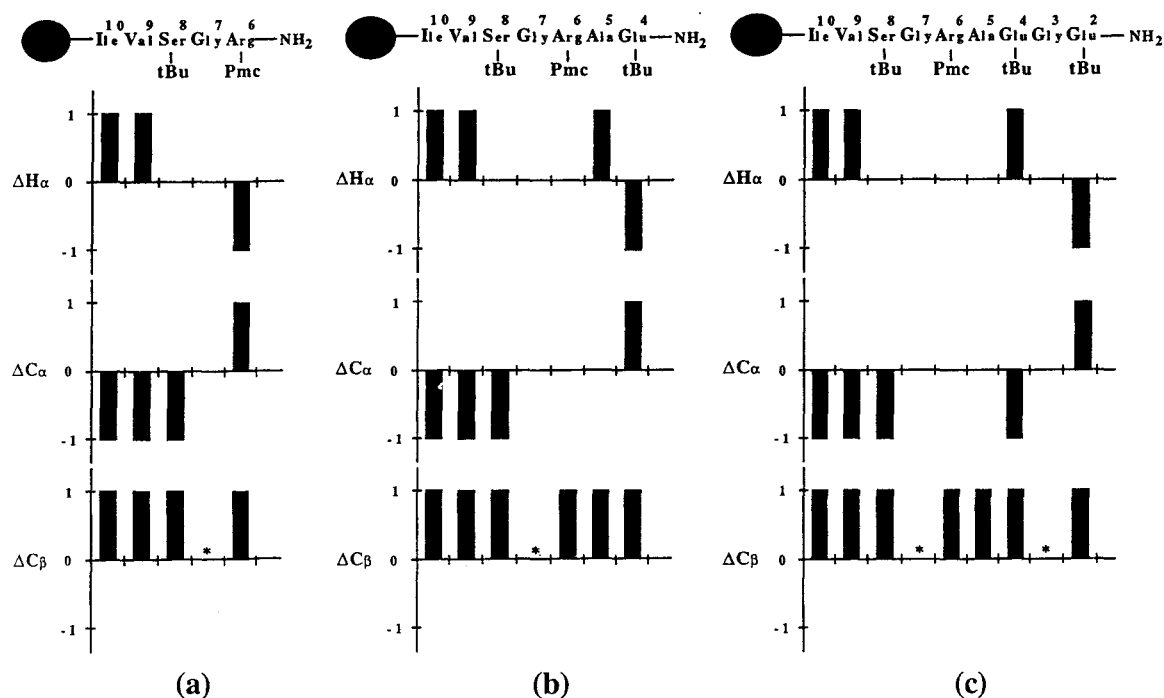


Figure 5. Summary of $^1\text{H}\alpha$, $^{13}\text{C}\alpha$, and $^{13}\text{C}\beta$ chemical shift indices according to the method of Wishart for the 5- (a) and 7- (b) residue peptidyl-resins swollen in DMF- d_7 , and the 9- (c) residue peptidyl-resin swollen in a solvent mixture of DMF- d_7 /DMSO- d_6 (80/20, v/v). The glycine residues on the $^{13}\text{C}\beta$ axis are noted with an asterisk (*). The ^1H and ^{13}C chemical shifts were measured relative to TMS.

Table 1. Bead Mean Diameter and Coupling Yields

A. 9-Residue Peptidyl-Resin (next amino acid to couple: *N*- α -Fmoc-*O*-*tert*-butylthreonine)

	bead diameter (μm) ^a	standard deviation (μm)	yield (%)	
			1 equiv/20 min ^b	4 equiv/60 min ^c
dry	68	6		
DMF	110	8	58	99.1
DMF/DMSO (80/20)	121	7	67	99.4

B. 10-Residue Peptidyl-Resin (next amino acid to couple: *N*- α -Fmoc-isoleucine)

	bead diameter (μm) ^a	standard deviation (μm)	yield (%)	
			1 equiv/20 min ^d	4 equiv/60 min ^e
dry	71	6		
DMF	94	5	36	98.1
DMF/DMSO (80/20)	108	5	46	98.4
DMF/DMSO (60/40)	123	8	61	99.2
DMF/DMSO (40/60)	110	10	60	99.3

^a Measured under a light microscope on a population of 250 beads/solvation condition. ^b 1 molar excess of *N*- α -Fmoc-*O*-*tert*-butylthreonine, HOBt, and HBTU and 2 molar excess of DIEA; reaction time 20 min; coupling yield measured by the quantitative picric acid test. ^c 4 molar excess of *N*- α -Fmoc-*O*-*tert*-butylthreonine, HOBt, and HBTU and 8 molar excess of DIEA; reaction time 45 min; coupling yield measured by the quantitative ninhydrin test. ^d 1 molar excess of *N*- α -Fmoc-isoleucine, HOBt, and HBTU and 2 molar excess of DIEA; reaction time 20 min; coupling yield measured by the picric acid test. ^e 4 molar excess of *N*- α -Fmoc-isoleucine, HOBt, and HBTU and 8 molar excess of DIEA; reaction time 45 min; coupling yield measured by the quantitative ninhydrin test.

and Fmoc-Ile have been coupled to the 9- and 10-residue peptidyl-resins, respectively. For both the 9- and 10-residue peptidyl-resins the coupling yields increase upon addition of DMSO. For the 10-residue peptidyl-resin, the efficiency improved when using 40% DMSO and stayed constant to within experimental error when the DMSO concentration was further increased (Table 1B).

Discussion

The combined swelling of the resin and the MAS NMR technique have led to the complete ^1H and ^{13}C resonance assignments of the peptide chains during solid-phase peptide synthesis. It should be stressed here that the full assignment could be obtained without any isotopic labeling, giving the method a decisive advantage over other spectroscopic tech-

niques, such as IR-FT, EPR, or ^{13}C gel-phase NMR, and making its routine use during an actual synthesis completely feasible. The chemical shift information was combined with the distance information from homonuclear NOE spectra and indicated an extended structure for the peptide through its elongation. The anomalous chemical shift for the $\text{H}\alpha$ resonance of the last coupled amino acid with a free amino group points toward a very specific conformation of this residue or to a local or global pH effect. We are still in the process of elucidating its structural and chemical origin but should already point out that the chemical shift anomaly can be advantageously used to monitor the correct deprotection of the chains.

While the swelling with DMF proved to be satisfactory for the peptidyl-resin with eight or less residues, the NMR analysis of the 9- and 10-residue peptidyl-resins was nearly impossible

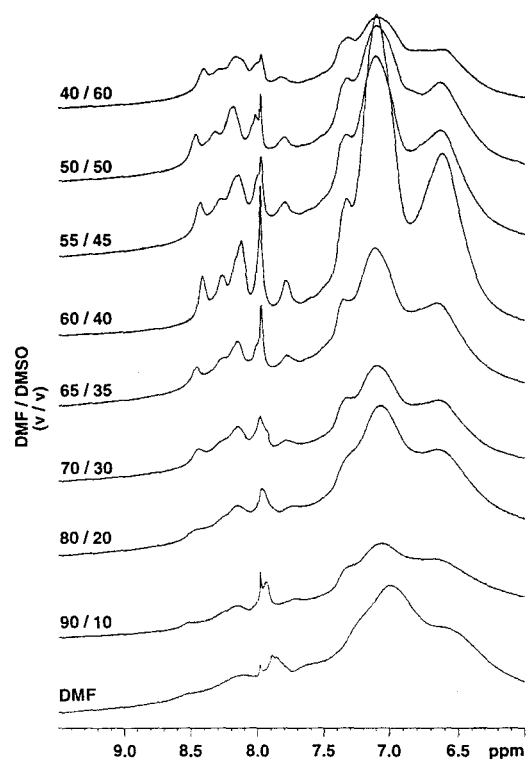


Figure 6. ^1H 1D MAS (4 kHz) spectra of the 10-residue peptidyl-resin (resin-Ile-Val-Ser(Or-Bu)-Gly-Arg(Pmc)-Ala-Glu(Or-Bu)-Gly-Glu(Or-Bu)-Thr(Or-Bu)-NH₂) swollen in various solvent mixtures of DMF-*d*₇/DMSO-*d*₆.

due to excessive ^1H line broadening. We and others^{17,18} previously have shown that correct swelling of the beads is crucial for the applicability of the technique. Similarly, it has since been long known in peptide chemistry that satisfactory coupling yields cannot be obtained without a good solvation of both the cross-linked polymer and the growing peptide chains. The level of solvation which determines the accessibility of the peptide chains to the deprotecting and acetylating reagents inside the polymeric network is not necessarily constant throughout the peptide elongation. According to the Merrifield strategy, solid-phase peptide synthesis begins in an apolar environment due to the polystyrene matrix, and this environment evolves gradually toward a more polar nature when the peptide chains grow. If the nature of the solvents does not evolve in a parallel way, aggregation and consequently additional cross-linking into the peptidyl-resin complex (depending on the sequence, the side-chain protection and the resin loading) may result.⁹

When coupling difficulties arise in solid-phase peptide synthesis, both allowing a longer reaction time and speeding up the reaction kinetics by increasing the reagent concentration and/or the temperature³¹ are used to improve the coupling yield. The repetition of the reactions or the use of a low-resin substitution⁹ is also often applied to increase reaction efficiency. Another strategy is aimed directly toward diminishing the aggregation of the chains, by the incorporation of either amino acids with a secondary α -amino group,³² where the nitrogen can no longer act as a hydrogen bond donor, or an oxazolidine-protected pseudo-proline³³ that can additionally introduce a kink in the growing peptide chain. An alternative strategy to improve

(31) Yamashino, D.; Blake, J.; Li, C. H. *Tetrahedron Lett.* **1976**, *18*, 1469–1472.

(32) Bedford, J.; Hyde, C.; Johnson, T.; Jun, W.; Owen, D.; Quibell, M.; Sheppard, R. C. *Int. J. Pept. Protein Res.* **1992**, *40*, 300–307.

(33) (a) Mutter, M.; Nefzi, A.; Sato, T.; Sun, X.; Wahl, F.; Waehr, T. *Pept. Res.* **1995**, *8*, 145–153. (b) Haack, T.; Mutter, M. *Tetrahedron Lett.* **1992**, *33*, 1589–1592.

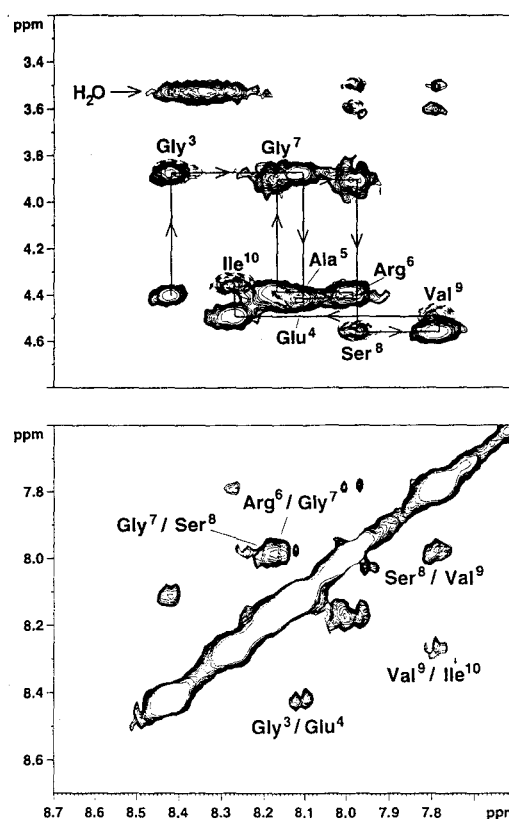


Figure 7. Stretches of the ^1H sequential assignment of the 10-residue peptidyl-resin (resin-Ile¹⁰-Val⁹-Ser⁸(Or-Bu)-Gly⁷-Arg⁶(Pmc)-Ala⁵-Glu⁴(Or-Bu)-Gly³-Glu²(Or-Bu)-Thr¹(Or-Bu)-NH₂) swollen in a solvent mixture of DMF-*d*₇/DMSO-*d*₆ (60/40, v/v). The top of the figure shows the superimposition of the NH-H α domain of the MAS (4 kHz) TOCSY (70 ms) spectrum and the MAS (4 kHz) NOESY (150 ms) spectrum. Labels are added to the (dashed lines) intraresidue NH-H α TOCSY cross-peaks. Full lines connect the interresidue sequential NOE cross-peaks. The bottom of the figure shows the NH-NH domain of the MAS NOESY spectrum.

the chain solvation is the use of chaotropic salts such as LiCl or LiBr³⁴ or aprotic polar solvents as efficient hydrogen bond acceptors.^{5,9,10,35} The latter strategy also seemed suitable to extend the applicability of the MAS NMR analysis to the longer peptides. We therefore have done both a structural and chemical evaluation of the two critical coupling steps in different solvent mixtures, in an attempt to examine at the molecular level the origin of the coupling difficulties. Evaluation of the individual swollen bead diameters was previously shown to be an easy and rapid technique to predict the success of the MAS NMR results. For the 9-residue peptide, addition of 20% DMSO increased the bead diameter by 10%, which is equivalent to a volume increase of some 30%. An extensive titration of DMSO with the 10-residue peptidyl-resin showed an almost 30% increase of bead diameter for the optimal DMF/DMSO ratio of 60/40 (v/v), whereas for both lower and higher DMSO concentrations, the beads again shrink.

Whereas the swollen bead diameter is a macroscopic parameter indicating the space available to the peptide chains, the NMR spectra provide a direct measure of their residual mobility.

(34) (a) Hendrix, J. C.; Halverson, K. J.; Jarrett, J. T.; Lansbury, P. T. *J. Org. Chem.* **1990**, *55*, 4517–4518. (b) Thaler, A.; Seebach, D.; Cardinaux, F. *Helv. Chim. Acta* **1991**, *74*, 628–643.

(35) (a) Pugh, K. C.; York, E. J.; Stewart, J. M. *Int. J. Pept. Protein Res.* **1992**, *40*, 208–213. (b) Cilli, E. M.; Oliveira, E.; Marchetto, R.; Nakaie, C. R. *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 8992–9000. (c) Oliveira, E.; Marchetto, R.; Jubilut, G. N.; Paiva, A. C. M.; Nakaie, C. R. In *Peptides: Chemistry, Structure and Biology; Proceedings of the 12th American Peptide Symposium*; Smith, J., Rivier, J., Eds.; ESCOM: Leiden, 1992; pp 569–570.

Addition of DMSO increased the mobility of the peptide chains, resulting in an important line narrowing of the proton lines in the MAS NMR spectra. As the chemical yields increased simultaneously, we can conclude that chain mobility is a determining factor for both spectral quality and chemical optimization. The structural results of the 9- and 10-residue peptidyl-resins give also important insights into the molecular nature of the coupling difficulties. Whereas we do not have direct evidence about the structural nature of the 9- and 10-residue peptides in DMF, because of the poor line widths, the latter parameter does indicate reduced chain mobility due to interchain aggregation. When the NMR analysis became possible due to the addition of DMSO, the peptide was found in an extended conformation, analogous to the shorter peptides in DMF (Figures 4d,e and 5c). These results substantiate, at the difficult synthesis steps, the formation of peptide chain clustering owing to interchain association favored by the extended nature of the structure on resin beads. The aggregation can lead to an incomplete solvation of the peptidyl-resin, resulting in a shrinkage of the gel matrix, a reduced reagent penetration, and finally a decrease in coupling yield. The hydrogen bond-accepting solvent DMSO, when added to DMF, worked as an aggregation disruptive additive in the polymeric network of the peptidyl-resin. The need to increase the polarity of the swelling solvent to analyze the peptidyl-resin when spectral degradation arises does reinforce the assumption of a hydrogen-bonded interchain association, rather than an aggregation of the chains stabilized by apolar contacts between protected side chains.¹⁰ The disruption of peptide aggregates allowed the remaining residual free amino functions to be more accessible for the deprotecting and acylating reagents inside the polymeric network resulting in better coupling efficiency at critical synthesis steps.

Conclusion and Perspectives

The MAS NMR technique is a sensitive and nondestructive analytical method to completely characterize peptides while still

bound to the solid support. Coupling difficulties and aggregation of the peptides on the beads were correlated by performing chemical analysis and MAS NMR spectroscopy in varying swelling solvent mixtures. The structural features of the peptide on beads showed that the main limiting factor to the synthesis is the hydrogen-bonded interchain association inside the polymeric network. We have shown that MAS-NMR offers a simple and fast method to evaluate the mobility and thus the solvation of the peptide chains into the peptidyl-resin complex. The 1D ¹H NMR spectrum taken on a sample of peptidyl-resin previously swollen in a suitable solvent mixture is sufficient to determine that this mixture allows an efficient solvation of the peptide chains in the polymer and the formation of an open gel system in which there is free access of reagents to active sites.

In this report we have focused on the identification of synthesis problems during elongation of difficult sequences. However, the structural analysis by MAS NMR can also be applied to resin-bonded peptides that adopt biologically relevant conformations. We are currently studying the applicability of the method to the field of biological screening with various ligand binding assays.

Acknowledgment. We thank Dr. M. Piotto and Dr. P. Lux (Bruker Spectrospin, France) for the solid-state MAS probe and Dr. M. Andrieux (Rhône Poulenc Agro, France) for his help in obtaining the carbon data. We also thank Dr. O. Melnyk for helpful discussions and Dr. D. David for careful reading of the manuscript. C.D. acknowledges receipt of a graduate fellowship cofinanced by Bruker Spectrospin (France) and the Région Nord-Pas de Calais (France). The 300 MHz facility used in this study was funded by the Région Nord-Pas de Calais (France), the CNRS, and the Institut Pasteur de Lille.

JA971795L

2.3 Etudes complémentaires

2.3.1 Un déplacement chimique inhabituel en ^1H

La résonance du groupement amine libre (NH_2) en position N-terminale du peptide sur résine n'a jamais pu être observée, et ceci indépendamment du solvant utilisé pour gonfler la résine (Pop *et al.*, 1996). Cette incapacité à observer l'extrémité libre (NH_2) est probablement due à une largeur de raie beaucoup trop importante.

Pour chacune des étapes de la synthèse, un déplacement chimique ^1H inhabituel a été observé: la résonance du proton $\text{H}\alpha$ appartenant à l'acide aminé (i) qui vient juste d'être couplé à la chaîne peptidique présente systématiquement un important déplacement vers les hauts champs à 3.30 ppm (la valeur habituelle pour un proton $\text{H}\alpha$ se situe entre 4 et 5 ppm). A l'étape suivante correspondant au couplage d'un nouveau résidu (j), la résonance du proton $\text{H}\alpha$ du résidu (i) retourne à sa valeur habituelle (≈ 4.50 ppm), tandis que maintenant l'effet est observé pour le proton $\text{H}\alpha$ du résidu (j) qui vient juste d'être couplé. Ce processus est récurrent: il apparaît à chacune des étapes de la synthèse et disparaît à l'étape suivante (voir Annexe I.5). Il est résumé de façon schématique sur la figure ci-dessous (Figure I.12)

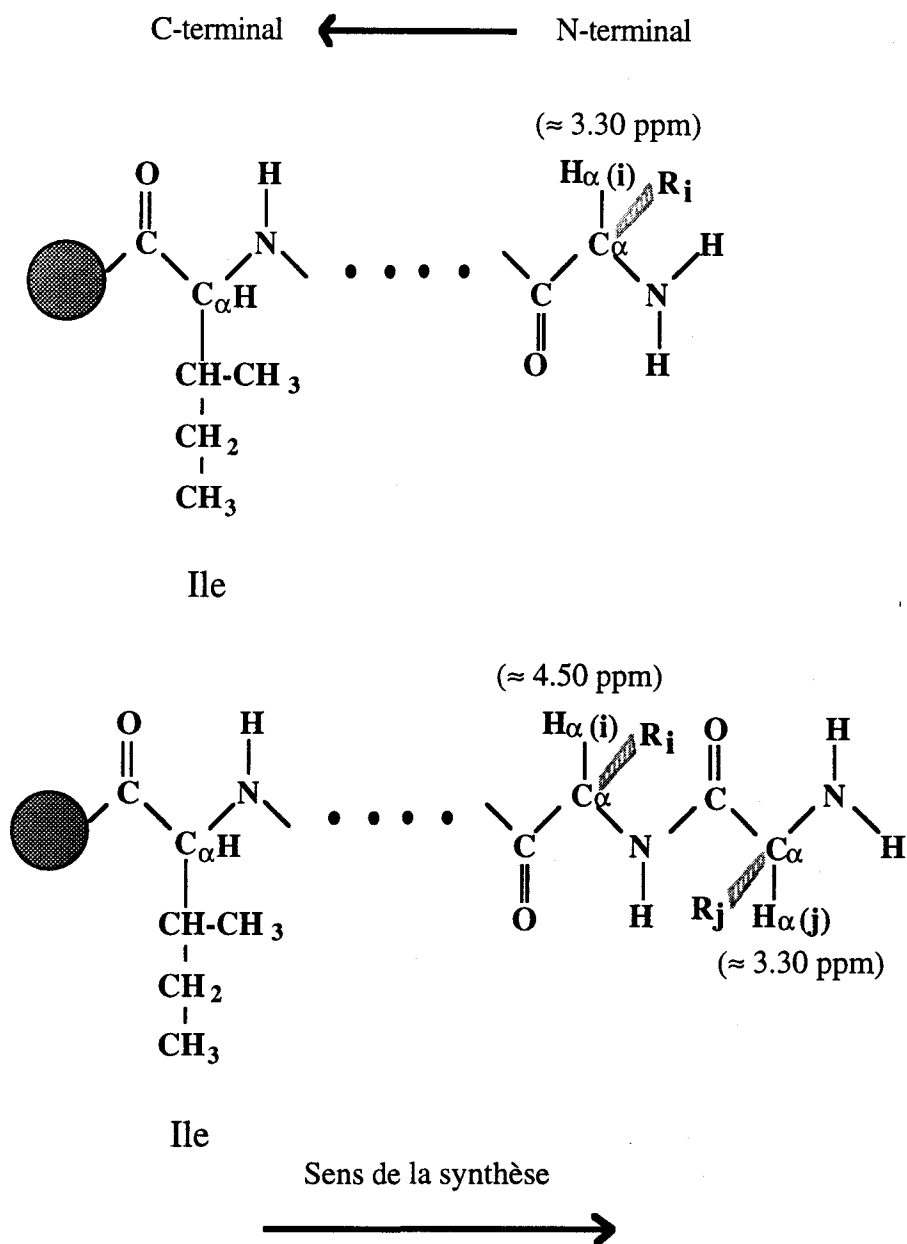


Figure I.12

Ce déplacement chimique inhabituel est indépendant du solvant utilisé pour gonfler la résine (Pop *et al.*, 1996), et n'apparaît que lorsque l'extrémité N-terminale du peptide en croissance est libre (NH_2). Lorsque cette extrémité est acétylée ou protégée par un groupe de type Fmoc, cet effet n'existe pas (voir Annexe I.5). De même lorsque le peptide est déprotégé, coupé de la résine et ensuite analysé en RMN liquide, dans le même solvant (DMF-d_7) que celui qui a servi à gonfler la

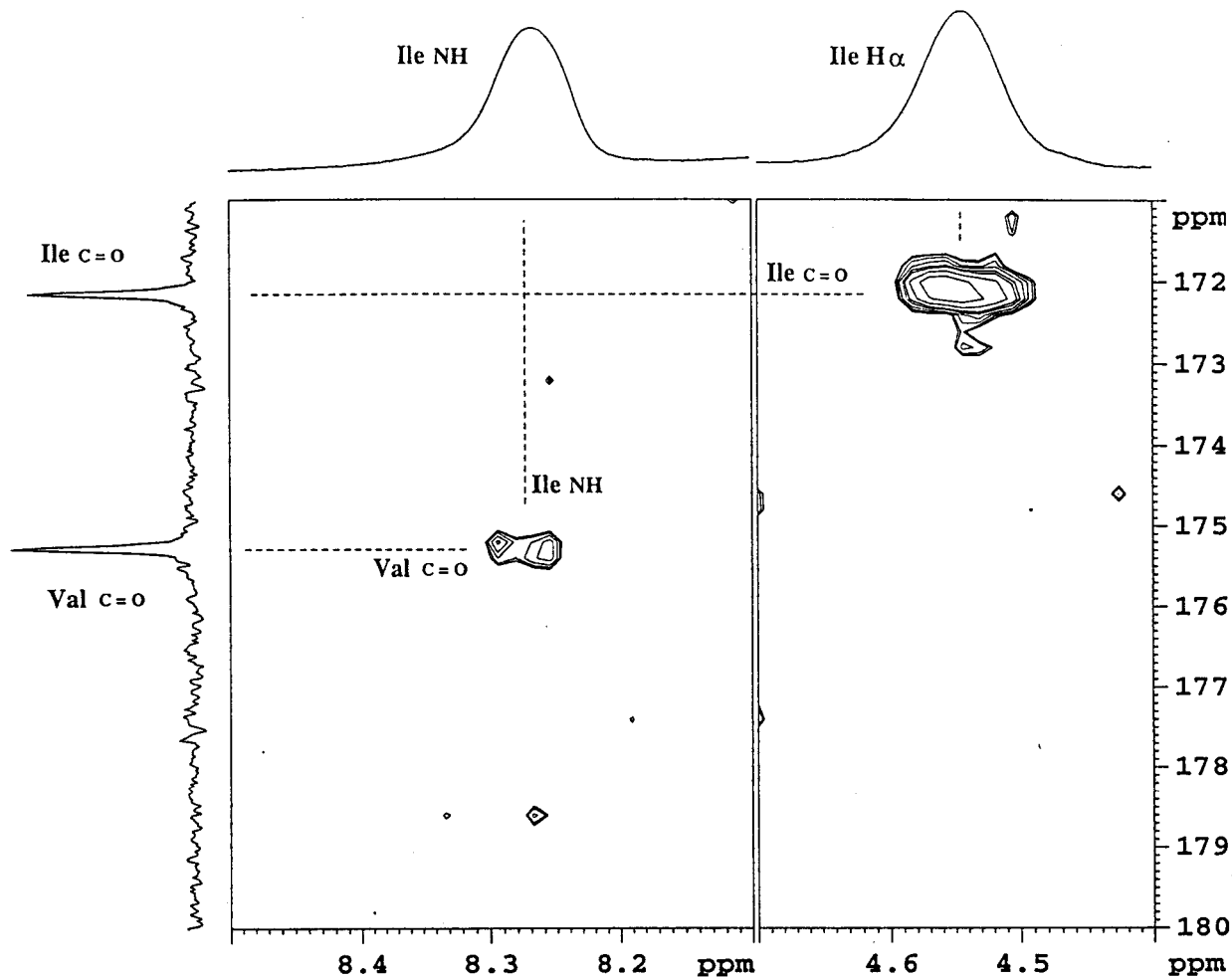
résine, le déplacement chimique du proton H α du premier résidu ne subit aucun effet et présente une valeur normale.

2.3.2 Un déplacement chimique inhabituel en ^{13}C

Aucun effet sur le déplacement chimique n'est observé pour le C α du dernier résidu couplé, la résonance de celui-ci reste toujours dans un domaine de déplacement chimique habituel dépendant bien sûr du résidu auquel il appartient.

Par contre un déplacement chimique inhabituel est observé pour le carbonyle du résidu (i) qui vient juste d'être couplé: un déplacement de 3 à 4 ppm vers les bas champs de la résonance du carbonyle du dernier résidu est systématiquement observé. A l'étape de couplage suivante, cette résonance retourne dans le domaine de résonance des autres carbonyles de la molécule et l'effet est observé pour le carbonyle du résidu (j) qui vient juste d'être couplé.

Cette observation est illustrée sur la figure I.13 pour la peptidyl-résine (Résine Wang)-Ile-Val-NH $_2$ avant et après le couplage de la valine. Le déplacement chimique du carbonyle de l'isoleucine est 175.28 ppm, après le couplage de la valine, il devient 172.14 ppm, et le carbonyle de la valine est à 175.94 ppm. L'attribution des deux carbonyles a été obtenue à partir des spectres 1D ^{13}C et du spectre ^1H - ^{13}C MAS HMBC (Bax & Summers, 1986) pour la peptidyl-résine (Résine Wang)-Ile-Val-NH $_2$ gonflée dans le DMF- d_7 . Sur le spectre ^1H - ^{13}C MAS HMBC (50 ms), deux pics de corrélation importants nous ont permis d'attribuer sans ambiguïté les carbonyles des deux résidus: un pic de corrélation entre le proton H α et le carbonyle de l'isoleucine, et un pic de corrélation entre le proton amide de l'isoleucine et le carbonyle de la valine. Sur la figure I.14 est représenté le type de couplage ^1H - ^{13}C que l'on peut observer pour le squelette peptidique pendant l'expérience HMBC.



MAS $^1\text{H}-^{13}\text{C}$ HMBC (50 ms)

● - Ile - Val - NH_2 DMF - d_7

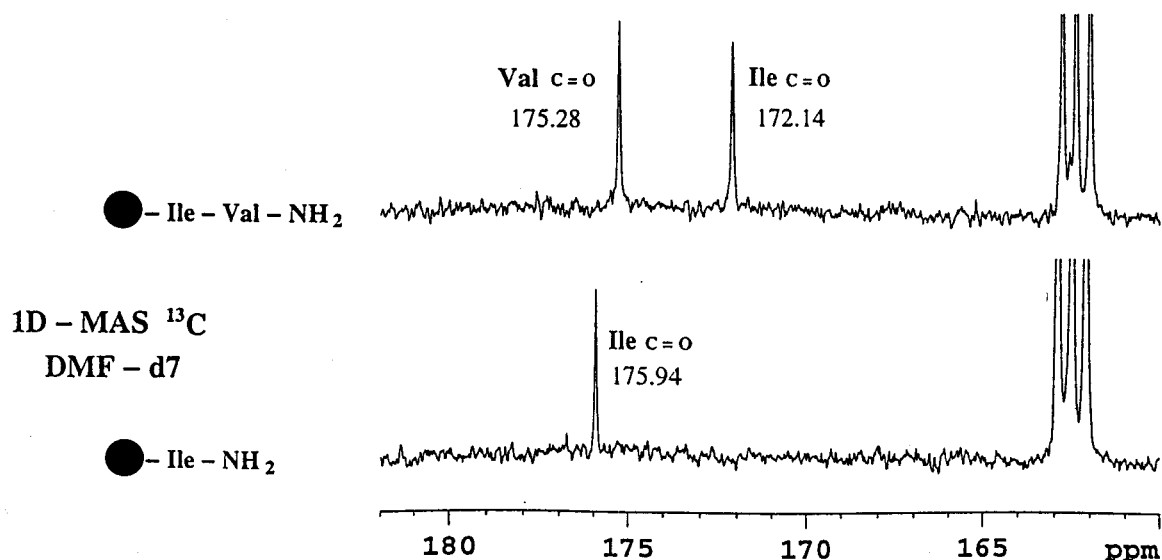


Figure I.13: (Haut) Spectre 2D $^1\text{H}-^{13}\text{C}$ MAS ($\omega_r = 4$ kHz) HMBC (50 ms) de la peptidyl-résine (Résine Wang)-Ile-Val- NH_2 gonflée dans DMF- d_7 . (Bas) Spectres 1D ^{13}C des peptidyl-résines (Résine Wang)-Ile-Val- NH_2 et (Résine Wang)-Ile- NH_2 gonflées dans le DMF- d_7 .

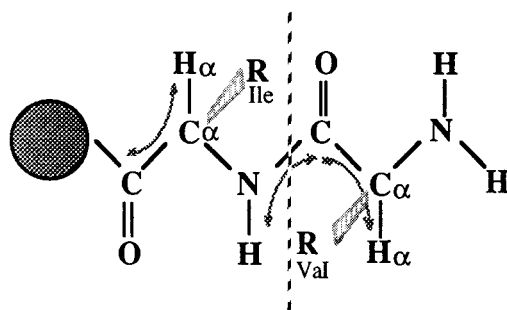


Figure I.14

Il semble clair que l'effet récurrent de déplacement vers les bas champs de la résonance du carbonyle du dernier résidu couplé, est lié à une conformation particulière adoptée par ce résidu sur la résine. Les déplacements chimiques en ^{13}C sont sensibles à la conformation adoptée par le squelette peptidique: un déplacement vers les bas champs (pouvant atteindre 10 ppm) d'un carbonyle est observé lorsque celui-ci est engagé dans une liaison hydrogène (Saito, 1986).

2.3.3 Origine des déplacements chimiques du proton $\text{H}\alpha$ et du carbonyle du dernier résidu couplé

Une hypothèse a été formulée quant à la nature *trans* ou *cis* de la liaison peptidique reliant le résidu (i) au résidu (j) qui vient juste d'être couplé (Figure I.12), pour expliquer la valeur inhabituelle des déplacements chimiques du proton $\text{H}\alpha$ et du carbonyle du résidu (j).

L'incorporation d'une proline

Pour tenter de répondre à cette question, nous avons synthétisé un peptide de cinq acides aminés contenant une proline, l'extrémité N-terminale restant libre (NH_2): (Résine Wang)-Ile-Val-Ser(OtBu)-Pro-Arg(Pmc)- NH_2 . Le résidu proline a été choisi de façon à voir l'effet du couplage d'un nouveau résidu (ici une arginine) sur la nature de la liaison peptidique arginine-proline en position N-terminale de la peptidyl-résine. Si cette liaison est de type *trans* nous observerons des

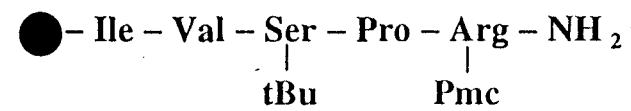
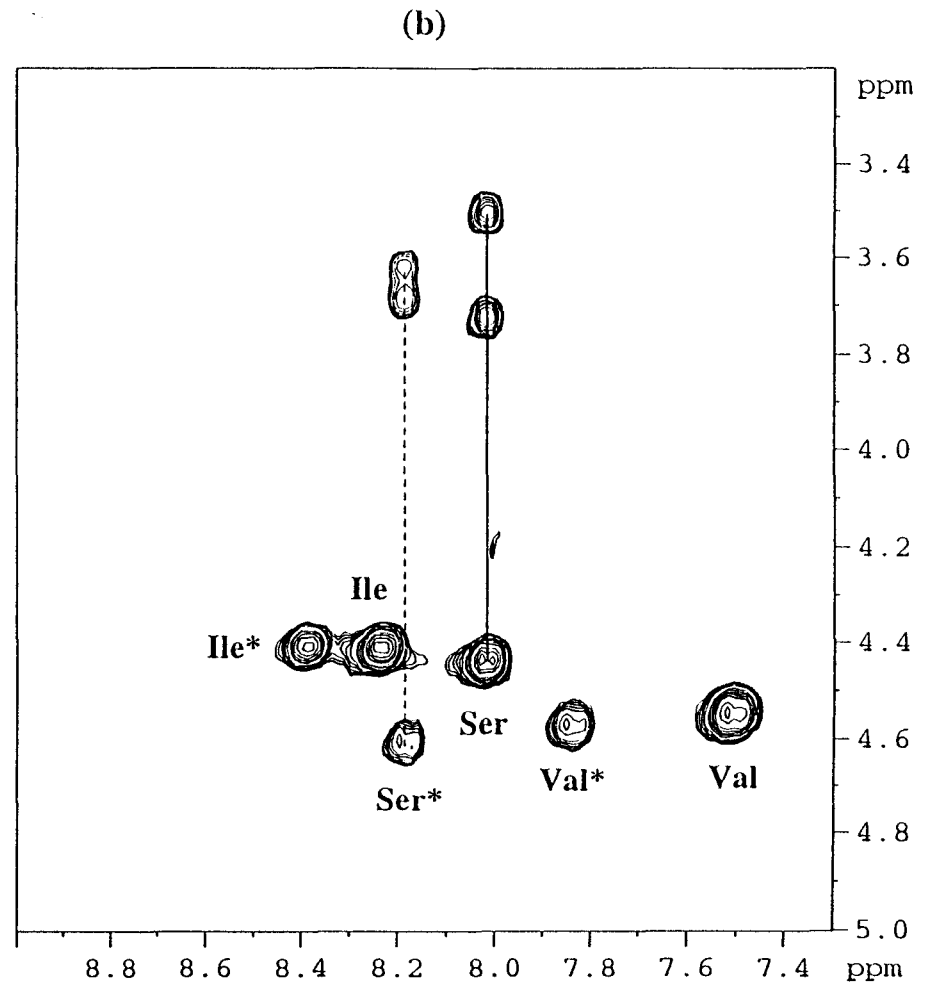
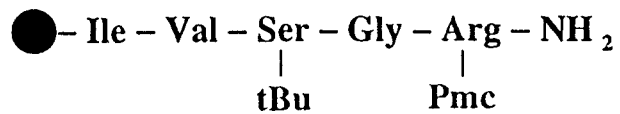
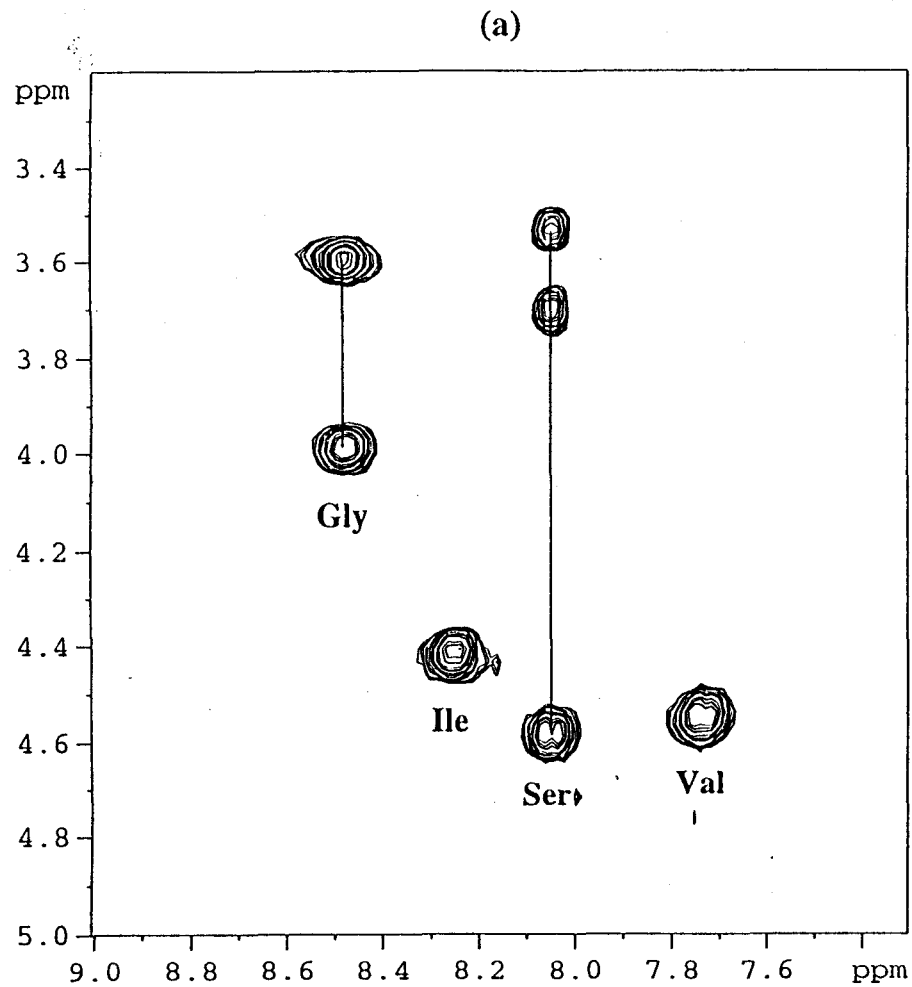


Figure I.15: Domaines NH-H α des spectres 2D MAS ($\omega_r = 4$ kHz) TOCSY (70 ms) des peptidyl-résines (Résine Wang)-Ile-Val-Ser(OtBu)-Gly-Arg(Pmc)-NH₂ (a) et (Résine Wang)-Ile-Val-Ser(OtBu)-Pro-Arg(Pmc)-NH₂ (b) gonflées dans le DMF-*d*₇. Pour ce dernier échantillon, le système minoritaire dû à l'isomérisation de la proline est marqué par une *.

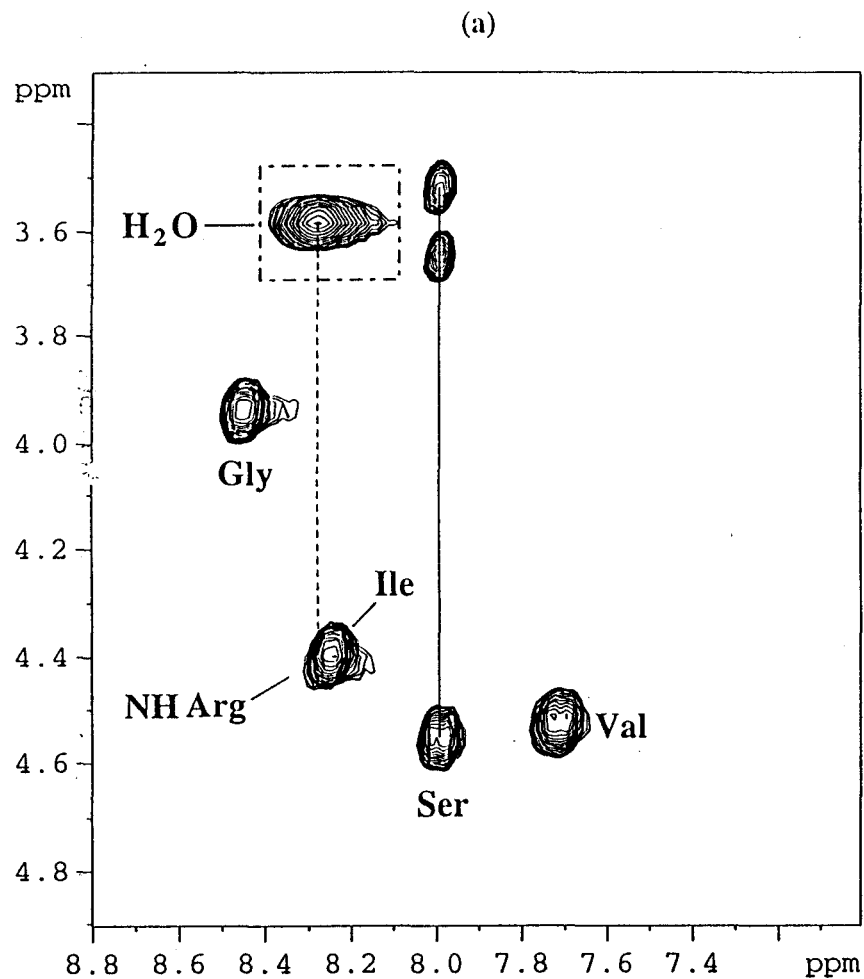
contacts NOE de type $H\alpha(\text{Arg}) / H\delta\delta'(\text{Pro})$, si elle est de type *cis* un contact NOE de type $H\alpha(\text{Arg}) / H\alpha(\text{Pro})$ sera observé (Wüthrich, 1986).

La résonance du proton $H\alpha$ de la proline se trouve à une valeur habituelle (≈ 4.55 ppm), alors que celle du proton $H\alpha$ de l'arginine se trouve à 3.30 ppm. Cependant, même avec l'introduction d'une proline, nous ne pouvons pas conclure à partir des contacts NOE quant à la nature *trans* ou *cis* de la liaison peptidique: la résonance du proton $H\alpha$ de l'arginine correspond exactement à la résonance des protons $H\delta\delta'$ de la proline qui sont confondus.

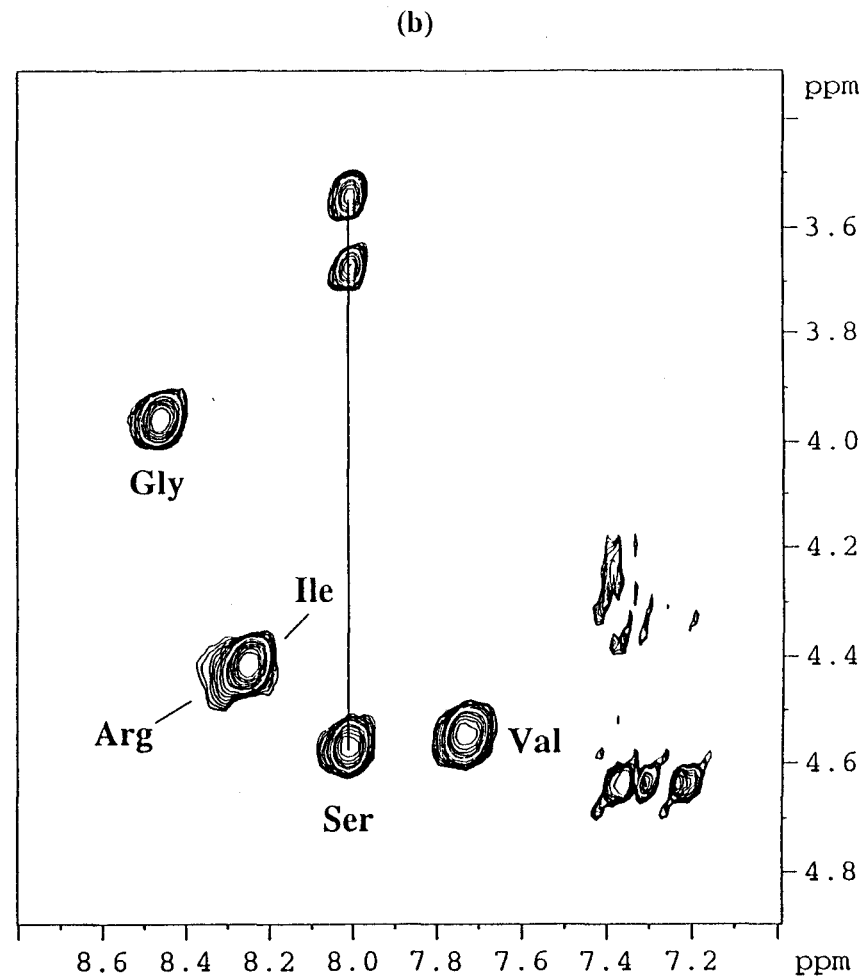
Un autre effet a été observé. Une isomérisation *cis/trans* de la proline, comparable à celle que l'on peut observer en solution pour un petit peptide contenant des prolines (Francart *et al.*, 1996), a été identifiée pour la peptidyl-résine. Pour les trois derniers résidus de la séquence, derrière la proline, deux systèmes de spins distincts en ^1H ont été identifiés. Cette isomérisation *cis/trans* de la proline est illustrée sur la figure I.15 (a), où sont reportés les deux systèmes de spins majoritaire et minoritaire (marqué par une *) sur le domaine NH- $H\alpha$ de la carte MAS TOCSY. Pour comparaison, sur la figure I.15 (b), est reporté le même domaine NH- $H\alpha$ de la carte MAS TOCSY du peptide (Résine Wang)-Ile-Val-Ser(OtBu)-Gly-Arg(Pmc)-NH₂ dans le DMF-*d*₇.

L'incorporation d'un acide aminé non naturel en position N-terminale

Nous avons synthétisé un peptide de six résidus portant un acide aminé non naturel en position N-terminale, une D-alanine dont l'extrémité est libre (NH₂): (Résine Wang)-Ile-Val-Ser(OtBu)-Gly-Arg(Pmc)-(D-Ala)-NH₂. Ainsi nous espérons observer pour les protons de la chaîne latérale de l'alanine un effet semblable à celui observé pour le proton $H\alpha$ du dernier résidu couplé. Aucune modification n'est observée: la résonance du proton $H\alpha$ de la D-alanine reste à 3.40 ppm et celles des protons du groupement méthyle de la chaîne latérale sont observés à 1.20 ppm.



DMF - d7



DMF - d7 / Alcool benzylique (20 équivalents)

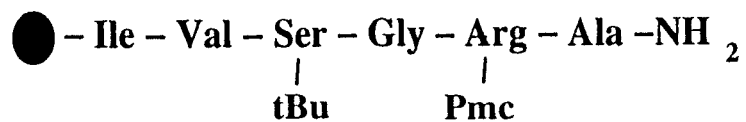


Figure I.16: Domaines NH-H α des spectres 2D MAS ($\omega_r = 4$ kHz) TOCSY (70 ms) de la peptidyl-résine (Résine Wang)-Ile-Val-Ser(OtBu)-Gly-Arg(Pmc)-Ala-NH₂ gonflée dans le DMF-d7 (a), et dans un mélange DMF-d7 / alcool benzylique (20 équivalents) (b).

Les essais d'incorporation d'une proline ou d'un acide aminé non naturel, ne nous permettent pas de comprendre l'origine de ces déplacements importants des résonances du proton $H\alpha$ et du carbonyle du dernier résidu couplé sur la peptidyl-résine. Néanmoins il est clair que c'est la nature de l'extrémité N-terminale libre (NH_2) qui est responsable de ces déplacements. Il est fort probable que ces effets récurrents correspondent à une conformation particulière adoptée par le résidu lorsqu'il vient juste d'être couplé à la peptidyl-résine.

2.3.4 Hypothèse conformationnelle pour le résidu en position N-terminale du peptide sur la résine

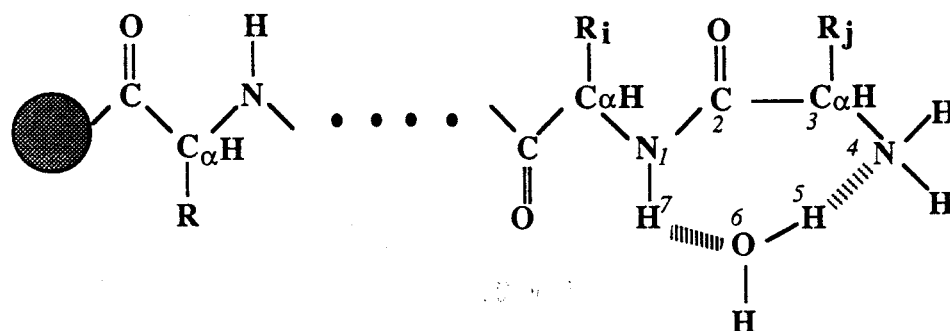
A partir de la sixième étape de la synthèse, un pic de croisement supplémentaire est observé sur les cartes MAS TOCSY et MAS NOESY. Ce pic connecte la résonance des protons de l'eau résiduelle (≈ 3.50 ppm), et le proton amide de l'avant dernier résidu couplé (i). Cette observation, comme l'effet sur le proton $H\alpha$ et le carbonyle du dernier résidu couplé (j), est récurrente, et ce pic n'est observé que lorsque l'extrémité N-terminale du peptide est libre (NH_2): elle concerne systématiquement et uniquement l'avant dernier résidu couplé (i) (Figure I.12). Ce pic serait dû à un phénomène d'échange relativement lent entre les protons des molécules d'eau et le proton amide de l'avant dernier résidu couplé.

Cette observation est illustrée sur la figure I.16 (a) où est reporté le domaine NH- $H\alpha$ de la carte MAS TOCSY du peptide de six résidus sur la résine de Wang (Résine Wang)-Ile-Val-Ser(OtBu)-Gly-Arg(Pmc)-Ala- NH_2 gonflée dans le $DMF-d_7$. Un pic d'échange est observé entre les protons de l'eau et le proton amide de l'avant dernier résidu couplé: l'arginine.

Avant la sixième étape, ce phénomène d'échange n'est pas observé, mais il est possible que celui-ci existe. L'eau présente dans l'échantillon pourrait provenir de l'eau résiduelle du solvant $DMF-d_7$ que nous utilisons pour gonfler la résine, mais il est aussi probable qu'une quantité d'eau soit apportée au cours de chaque couplage lors de la synthèse.

Dans un premier temps, nous avons tenté d'échanger ces molécules d'eau en utilisant un mélange DMF- d_7 / D_2O (jusqu'à 5% en D_2O) pour gonfler la résine. Cela n'eut aucun effet sur l'échange: le pic d'échange avec l'eau resta présent et intense. Ceci peut s'expliquer par la difficulté qu'ont les molécules d'eau deutérée à pénétrer à l'intérieur des billes pour s'échanger avec des molécules d'eau proches du peptide (ou liées au peptide). Ensuite, nous avons utilisé un solvant polaire qui présente une affinité plus importante que l'eau pour la matrice de polystyrène divinylbenzène des billes: l'alcool benzylique. Une forte diminution de l'intensité du pic d'échange avec l'eau jusqu'à sa disparition a été observée en utilisant un mélange d'alcool benzylique non deutéré (20 équivalents) et de DMF- d_7 pour gonfler la résine (Figure I.16 (b)). Cela signifierait que (1) les molécules d'alcool benzylique ont été capables de pénétrer à l'intérieur des billes, (2) et que nous avons déplacé les molécules d'eau du peptide à l'intérieur des billes, en favorisant les interactions polaires des molécules d'eau et des molécules d'alcool benzylique. La résonance du proton $H\alpha$ du dernier résidu couplé, une alanine, reste déplacée vers les hauts champs à 3.60 ppm.

Les effets récurrents observés, (1) sur les déplacements chimiques du proton $H\alpha$ et du carbonyle du dernier résidu couplé, (2) et sur le phénomène d'échange entre l'eau et le proton amide de l'avant dernier résidu, nous laissent penser à une conformation particulière systématiquement adoptée par le dernier résidu de la peptidyl-résine (extrémité libre NH_2). Nous avons émis l'hypothèse d'une cyclisation du peptide en position N-terminale via des liaisons hydrogènes avec une molécule d'eau. Un modèle pourrait être le suivant: une molécule d'eau engagée dans deux liaisons hydrogènes (ou plusieurs), reliant les résidus (i) et (j) de la peptidyl-résine en position N-terminale comme illustré sur la représentation schématique ci dessous:



2.4 Conclusion

La technique RMN MAS est une méthode analytique sensible, rapide et non destructrice permettant la caractérisation complète de séquences peptidiques sur support solide. Les difficultés de couplage rencontrées durant la synthèse du peptide Aggrecan (Simmonds, 1996) et le phénomène d'agrégation des chaînes peptidiques sur les billes de résine, ont été corrélés à la fois par les données RMN MAS et par des mesures physiques et chimiques. La structure secondaire de type étendue qu'adopte le peptide sur les billes montre que le problème majeur durant cette synthèse est une agrégation des chaînes peptidiques, stabilisée par la formation de liaisons hydrogènes. Nous avons montré que l'utilisation d'un mélange DMF / DMSO permettait de rompre ces liaisons, et d'augmenter la mobilité des chaînes peptidiques conduisant à une amélioration de la solvation de la peptidyl-résine, ainsi qu'à une amélioration des rendements de couplage aux étapes critiques de la synthèse.

2.5 Perspectives

La technique RMN MAS va permettre de mieux comprendre certains aspects mal décrits ou non compris de la synthèse peptidique. Elle va permettre notamment d'étudier structurellement l'influence de facteurs physiques et chimiques sur la synthèse. La stratégie de protection des chaînes latérales, la nature et la charge de la résine, l'incorporation de groupement non peptidique ou d'acides aminés stériquement encombrants, la nature du solvant, l'incorporation d'agents chaotropiques et la température sont des paramètres dont les effets vont pouvoir être étudiés grâce aux résultats des données RMN. Ainsi, des améliorations des conditions de synthèse pourront être envisagées.

Nous pouvons aussi envisager d'établir une méthode de détermination de la structure secondaire des peptides sur résine, comparable à la méthode de Wishart (Wishart *et al.*, 1992, 1995; Wishart & Sykes, 1994) pour les protéines en solution aqueuse. Pour cela, il faut établir une table des déplacements chimiques en ^1H et en ^{13}C pour les 20 acides aminés non protégés et en conformation aléatoire sur résine. Une détermination rapide de la structure secondaire adoptée par le

peptide sur résine pourra alors être obtenue en calculant la déviation de ses déplacements chimiques par rapport aux valeurs reportées dans la table.

Pour les peptides qui s'agrègent en solution aqueuse, la technique RMN MAS pourra fournir des informations structurales très importantes en vue de comprendre les modifications structurales que subissent ces molécules, et ainsi de mieux comprendre les relations structure/fonction: l'ancrage à une résine dont on maîtrise la charge devrait simuler un état de très haute dilution. Dans le cas de la protéine du prion qui s'agrège en solution (Heller *et al.*, 1996; Riek *et al.*, 1996), il a été montré par RMN du solide que le choix du solvant dans lequel se trouve la protéine avant lyophilisation permet d'observer un changement de structure secondaire du fragment H1 à l'origine de la forme infectieuse de la protéine. Avec la technique RMN MAS sur support solide, nous pouvons espérer déterminer complètement, à partir des contacts NOE et des variations de déplacement chimique, la structure secondaire de ce fragment dans chacune de ses conformations (infectieuse et non-infectieuse) dans diverses conditions expérimentales.

D. Références

- Anderson, R. C.; Stokes, J. P.; Shapiro, M. J. *Tetrahedron Lett.* **1995**, *36*, 5311-5314.
- Anderson, R. C.; Jarema, M. A.; Shapiro, M. J.; Stokes, J. P.; Ziliox, M. *J. Org. Chem.* **1995**, *60*, 2650-2651.
- Andrew, E. R. "Magic Angle Spinning", Encyclopedia of Nuclear Magnetic Resonance, vol. 5, (Eds) D. M. Grant; R. K. Harris, John Wiley & Sons, New York, **1996**, pages 2891-2901.
- Andrew, E. R.; Bradbury, A.; Eades R. G. *Nature* **1959**, *183*, 1802-1803.
- Arad, O.; Houghten, R. A. *Pept. Res.* **1990**, *3*, 42-50.
- Barbara, T. M. *J. Magn. Res.* **1994**, Series A *109*, 265-269.
- Bax, A.; Griffey, R. H.; Hawkins, B. L. *J. Magn. Reson.* **1983**, *55*, 301-315.
- Bax, A.; Summers, M. F. *J. Am. Chem. Soc.* **1986**, *108*, 2093-2094.
- Braunschweiler, L.; Ernst, R. R. *J. Magn. Reson.* **1983**, *53*, 521-528.
- Cilli, E. M.; Marchetto, R.; Schreider, S.; Nakaie, C. R. *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38*, 517-520.
- Cohen-Tannoudji, C.; Diu, B.; Laloë, F. "Mécanique Quantique", Hermann, Paris, **1977**.
- Deber, C. M.; Lutek, M. K.; Heimer, E. P.; Felix, A. M. *Pept. Res.* **1989**, *2*, 184-188.
- Edmonds, A. R. "Angular momentum in quantum mechanics", Investigation in Physics, (Ed) R. Hofstadter, Princeton University Press, Princeton, New Jersey, **1957**.
- Egner, B. J.; Langley, G. J.; Bradley, M. *J. Org. Chem.* **1995**, *60*, 2653-2653.
- Fitch, W. L.; Detre, G.; Holmes, C. P.; Shooreley, J. N.; Keifer, P. A. *J. Org. Chem.* **1994**, *59*, 7955-7956.
- Francart, C.; Wieruszkeski, J.-M.; Tartar, A.; Lippens, G. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 7019-7027.
- Fucks, L. F.; Huang, F. S. C.; Carter, C. M.; Edelstein, W. A.; Roemer, P. R. *J. Magn. Reson.* **1992**, *100*, 229-242.
- Gallop, M. A.; Barrett, R. W.; Dower, W. J.; Fodor, S. P. A.; Gordon, E. M. *J. Med. Chem.* **1994**, *37*, 1233-1251.

- Garigipati, R. S.; Adams, B.; Adams, J. L.; Sarkar, S. K. *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 2911-2914.
- Garroway, A. N. *J. Magn. Res.* 1982, **49**, 168-171.
- Gerstein, B. C.; Dybowski, C. W., "Transient Techniques in NMR of solids", Academic Press, New York, 1985.
- Giralt, E.; Rizo, J.; Pedroso, E. *Tetrahedron* **1984**, *40*, 4141-4152.
- Gordon, E. M.; Barrett, R. W.; Dower, W. J.; Fodor, S. P. A.; Gallop, M. A. *J. Med. Chem.* 1994, **37**, 1285-1401.
- Gravert, D. J.; Janda, K. D. *Conference Proceedings series "Molecular Diversity and Combinatorial Chemistry : Libraries and Drug Discovery"*; Chaiken, I. M., Janda, K. D., Eds.; Am. Chem. Soc.: Washington, DC, **1996**; pp 118-127.
- Haeberlen, U. "High Resolution NMR in solids: Selective Averaging", (Eds) J. S. Waugh, Academic Press, New York, **1976**.
- Heller, J.; Kolbert, A. C.; Larsen, R.; Ernst, M.; Bekker, T.; Baldwin, M.; Prusiner, S. B.; Pines, A.; Wemmer, D. E. *Protein Science* **1996**, *5*, 1655-1661.
- Hiroshige, M.; Hauske, J. R.; Zhou, P. *Tetrahedron Lett.* **1995**, *36*, 4567-4570.
- Jelinek, R.; Valente, A. P.; Valentine, K. G.; Opella, S. J. *J. Magn. Reson.* **1997**, *125*, 185-187.
- Johnson, C. R.; Zhang, B. *Tetrahedron Lett.* **1995**, *36*, 9253-9256.
- Kaplan, J., "Chemical exchange effects on spectra". *Encyclopedia of Nuclear Magnetic Resonance*, vol. 2, (Eds) D. M. Grant; R. K. Harris, John Wiley & Sons, New York, **1996**, pages 1247-1256.
- Keifer, P. A.; Baltusis, L.; Rice, D. M.; Tymiak, A. A.; Shoolery, J. N. *J. Magn. Reson. A* **1996**, *119*, 65-75.
- Keifer, P. A. *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 1558-1559.
- Kumar, A.; Ernst, R. R.; Wüthrich, K. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1980**, *95*, 1-6.
- Krchnak, V.; Flegelova, Z.; Vagner, J. *Int. J. Pept. Protein Res.* **1993**, *42*, 450-454.
- Larsen, B. D.; Christensen, D. H.; Holm, A.; Zillmer, R.; Nielsen, O. F. *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 6247-6253.
- Look, G. C.; Holmes, C. P.; Chinn, J. P.; Gallop, M. A. *J. Org. Chem.* **1994**, *59*, 7588-7590.

- Lowe, I. J. *Phys. Rev. Lett.* **1959**, *2*, 285-287.
- Ludwick, A. G.; Jelinski, L. W.; Live, D.; Kintanar, A.; Dumais, J. J. *J. Am. Chem. Soc.* **1986**, *108*, 6493-6496.
- Maas, W. E.; Laukien, F. H.; Cory, D. G. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 13085-13086.
- Merrifield, R. B. *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, *85*, 2149-2154.
- Milton, R. C. L.; Milton, S. C. F.; Adams, P. A. *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 6039-6046.
- Pake, G. E. *J. Chem. Phys.* **1948**, *16*, 327-336.
- Pop, I.; Dhalluin, C.; Déprez, B.; Melnyk, P.; Lippens, G.; Tartar, A. *Tetrahedron* **1996**, *52*, 12209-12222.
- Riek, R.; Hornemann, S.; Wider, G.; Billeter, M.; Glockshuber, R.; Wüthrich, K. *Nature* **1996**, *382*, 180-182.
- Russell, K.; Cole, D. C.; McLaren, F. M.; Pivonka, D. E. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 7941-7945.
- Saito, H. *Magn. Res. in Chem.* **1985**, 835-852.
- Sarin, V. K.; Kent, S. B. H.; Tam, J. P.; Merrifield, R. B. *Anal. Biochem.* **1981**, *117*, 147-157.
- Sarkar, S. K.; Garigipati, R. S.; Adams, J. L.; Keifer, P. A. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 2305-2306.
- Simmonds, R. G. *Int. J. Pept. Protein Res.* **1996**, *47*, 36-41.
- Stewart, J. M.; Klis, W. A. In *Innovation and perspectives in solid phase synthesis. Peptides polypeptides and oligonucleotides*; Epton, R., Ed.; SPCC Ltd.: Birmingham, UK, **1990**; pp 1-9.
- Stoll, M. E.; Majors, T. J. *Phys. Rev. B* **1981**, *24*, 2859-2862.
- Svensson, A.; Fex, T.; Kihlberg, J. *Tetrahedron Lett.* **1996**, *37*, 7649-7652.
- Tam, J. P.; Lu, Y. A. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 12058-12063.
- VanderHart, D. L., "Magnetic Susceptibility in High Resolution NMR of Liquids and Solids". *Encyclopedia of Nuclear Magnetic Resonance*, vol. **5**, (Eds) D. M. Grant; R. K. Harris, John Wiley & Sons, New York, **1996**, pages 2938-2946.

VanWoerkom, W. J.; VanNispen, J. W. *Int. J. Pept. Protein Res.* **1991**, *38*, 103-113.

Wishart, D. S.; Sykes, B. D.; Richards, F. M. *Biochemistry* **1992**, *31*, 1647-1651.

Wishart, D. S.; Sykes, B. D. *J. Biomol. NMR* **1994**, *4*, 171-180.

Wishart, D. S.; Bigam, C. G.; Holm, A.; Hodges, R. S.; Sykes, B. D. *J. Biomol. NMR* **1995**, *5*, 67-81.

Wüthrich, K. *NMR of Proteins and Nucleic Acids*, John Wiley and Sons, New York, **1986**.

Annexes

Annexe I.1 Calcul des états énergétiques de deux spins 1/2 identiques en interaction dipolaire

A I.1.1 Les fonctions d'états d'un spin nucléaire I

Cas général

Les fonctions de spin, utilisées pour décrire les états d'un spin nucléaire I , sont les fonctions propres du Hamiltonien d'interaction Zeeman. Elles sont notées $|I m_I\rangle$, où I est le nombre quantique du spin nucléaire, et m_I est la composante selon l'axe (OZ) du moment angulaire de spin en unité \hbar .

Les notations utilisées sont celles empruntées à l'ouvrage de Cohen-Tannoudji et collaborateurs (Cohen-Tannoudji *et al.*, 1977).

Pour un spin I il existe $(2I + 1)$ fonctions propres ou vecteurs propres $|I m_I\rangle$ tels que $(-I \leq m_I \leq I)$ (par pas de une unité) qui constituent une base propre pour les opérateurs de spin $\{I^2, I_z\}$ du spin I . Les opérateurs I_x, I_y vérifient les relations:

$$I_z |I m_I\rangle = m_I |I m_I\rangle$$

$$I^2 |I m_I\rangle = I(I+1) |I m_I\rangle$$

L'opérateur ascendant I_+ (avec $I_+ = I_x + i I_y$) et l'opérateur descendant I_- (avec $I_- = I_x - i I_y$) de I vérifient:

$$I_{\pm} |I m_I\rangle = \sqrt{I(I+1) - m_I(m_I \pm 1)} |I m_I \pm 1\rangle$$

Les fonctions d'états d'un spin nucléaire I 1/2

Pour un spin I de 1/2, il n'existe que deux vecteurs d'états possibles notés $|\alpha\rangle$ et $|\beta\rangle$ qui constituent une base propre pour les opérateurs de spin $\{I_z, I^2\}$ du spin I.

Ces vecteurs propres sont notés $|I = 1/2, m_I = 1/2\rangle = |\alpha\rangle$, et $|I = 1/2, m_I = -1/2\rangle = |\beta\rangle$

$$I_z |\alpha\rangle = 1/2 |\alpha\rangle, I_z |\beta\rangle = -1/2 |\beta\rangle$$

$$I^2 |\alpha\rangle = 3/4 |\alpha\rangle, I^2 |\beta\rangle = 3/4 |\beta\rangle$$

$$I_+ |\beta\rangle = |\alpha\rangle, I_- |\alpha\rangle = |\beta\rangle$$

L'action des opérateurs I_+ et I_- sur les états $|\alpha\rangle$ et $|\beta\rangle$ respectifs est nul.

A I.1.2 Les fonctions d'états pour deux spins 1/2 identiques

Soient $\mathbf{m}_1 = \gamma \mathbf{I}_1$ et $\mathbf{m}_2 = \gamma \mathbf{I}_2$ les moments magnétiques associés à deux spins nucléaires 1/2 identiques ($\gamma_1 = \gamma_2 = \gamma$), \mathbf{I}_1 et \mathbf{I}_2 sans couplage scalaire J direct et de même glissement chimique.

En considérant que les deux spins \mathbf{I}_1 et \mathbf{I}_2 ne sont pas corrélés, les opérateurs de spin de \mathbf{I}_1 commutent avec les opérateurs de spin de \mathbf{I}_2 : $[I_{1\alpha}, I_{2\beta}] = 0$.

Les vecteurs d'états notés $|I_1, I_2, m_{11}, m_{12}\rangle$ représentent la base découplée de vecteurs propres des opérateurs de spin $\{I_{1z}, I_1^2, I_{2z}, I_2^2\}$. Pour déterminer les états énergétiques des deux spins il est

préférable de travailler avec la base couplée notée $|S m_s\rangle$, c'est à dire la base couplée associée au spin total $S = I_1 + I_2$.

La base $|S m_s\rangle$ représente la base couplée des vecteurs propres des opérateurs de spin $\{S_z, S^2, I_1^2, I_2^2\}$. Cette base est telle que $-(I_1 + I_2) \leq m_s \leq (I_1 + I_2)$. Deux valeurs de spins sont autorisées pour le spin total S ($S = 1, 0$) suivant la table A.I.1. La base complète des états propres de S est alors générée par deux sous espaces vectoriels associés à $S = 1, 0$.

m_{I_1}	$1/2$	$-1/2$
m_{I_2}	$1/2$	$-1/2$
	1	0
	0	-1

Table A.I.1

Le sous espace vectoriel associé à $S = 0$ est généré par un vecteur d'état $|S = 0 m_s = 0\rangle$, cet état est dit état singulet et ne participe pas à la résonance.

$$|S = 0 m_s = 0\rangle = \frac{1}{\sqrt{2}} \{ |\alpha_1\rangle |\beta_2\rangle - |\beta_1\rangle |\alpha_2\rangle \}$$

Le sous espace vectoriel associé à $S = 1$ est généré par trois vecteurs d'état qui peuvent être exprimés dans la base découplée des opérateurs de spin $\{I_{1z}, I_1^2, I_{2z}, I_2^2\}$, où $|\alpha_1\rangle$ et $|\beta_1\rangle$ sont les vecteurs propres associés au spin I_1 , et $|\alpha_2\rangle$ et $|\beta_2\rangle$ sont ceux rapportés au spin I_2 .

$$|S = 1 m_s = 1\rangle = |\alpha_1\rangle |\alpha_2\rangle$$

$$|S = 1 m_s = -1\rangle = |\beta_1\rangle |\beta_2\rangle$$

$$|S = 1 \ m_s = 0\rangle = \frac{1}{\sqrt{2}} \{ |\alpha_1\rangle |\beta_2\rangle + |\beta_1\rangle |\alpha_2\rangle \}$$

A I.1.3 Les états énergétiques de deux spins 1/2 identiques en interaction dipolaire

Considérons les deux spins 1/2 I_1 et I_2 comme étant des protons. Nous savons que l'intensité de l'interaction dipolaire homonucléaire $^1\text{H}-^1\text{H}$ est forte (20 - 50 kHz), mais néanmoins cette interaction reste faible devant l'intensité de l'interaction Zeeman (300 MHz à 6.5 T). Seuls les termes A et B du Hamiltonien d'interaction dipolaire seront conservés pour le calcul, ces termes commutent avec le Hamiltonien d'interaction Zeeman et sont liés à la forme de raie. Le Hamiltonien total qui va décrire les états énergétiques des deux spins s'exprimera par:

$$\mathcal{H}_{\text{Total}} = \mathcal{H}_{\text{Zeeman}} + \mathcal{H}_{\text{dipolaire}}$$

Pour l'interaction Zeeman des deux moments magnétiques avec le champ magnétique externe B_0 nous avons:

$$\mathcal{H}_{\text{Zeeman}} = - \gamma \hbar (\mathbf{I}_1 + \mathbf{I}_2) \cdot \mathbf{B}_0$$

$$\mathcal{H}_{\text{Zeeman}} = - \hbar \omega_0 (I_{1z} + I_{2z})$$

$$\langle \alpha_1 | \langle \alpha_2 | \mathcal{H}_{\text{Zeeman}} | \alpha_1 \rangle | \alpha_2 \rangle = - \hbar \omega_0$$

$$\langle \beta_1 | \langle \beta_2 | \mathcal{H}_{\text{Zeeman}} | \beta_1 \rangle | \beta_2 \rangle = \hbar \omega_0$$

$$\frac{1}{\sqrt{2}} \{ \langle \alpha_1 | \langle \beta_2 | + \langle \beta_1 | \langle \alpha_2 | \} \mathcal{H}_{\text{Zeeman}} \frac{1}{\sqrt{2}} \{ | \alpha_1 \rangle | \beta_2 \rangle + | \beta_1 \rangle | \alpha_2 \rangle \} = 0$$

Pour l'interaction dipolaire

$$\mathcal{H}_{\text{dipolaire}} = \hbar \omega_D \left\{ I_{1z} I_{2z} - \frac{1}{4} (I_{1+} I_{2-} + I_{1-} I_{2+}) \right\} (1 - 3 \cos^2 \theta)$$

$$\text{avec } \omega_D = \frac{\mu_0 \gamma_1 \gamma_2 \hbar}{4\pi r^3}$$

Le Hamiltonien dipolaire va être traité comme une perturbation. Comme les niveaux d'énergie associés à le Hamiltonien Zeeman sont non dégénérés, il suffit de calculer la valeur moyenne de la perturbation dipolaire sur les états propres du Hamiltonien Zeeman. La correction au 1^{er} ordre de l'énergie revient à calculer les éléments de matrice diagonaux des termes A et B dans la base du Hamiltonien Zeeman.

Calculons la perturbation au 1^{er} ordre de l'interaction dipolaire dans la base des états propres $|S m_s\rangle$.

en posant $\omega_D(\theta) = \omega_D (1 - 3 \cos^2 \theta)$ nous obtenons

$$\mathcal{H}_{\text{dipolaire}} |\alpha_1\rangle |\alpha_2\rangle = \omega_D(\theta) (I_{1z} I_{2z} - 1/4 (I_{1+} I_{2-} + I_{1-} I_{2+})) |\alpha_1\rangle |\alpha_2\rangle$$

$$\text{d'où } \langle \alpha_1 | \langle \alpha_2 | \mathcal{H}_{\text{dipolaire}} | \alpha_1 \rangle | \alpha_2 \rangle = 1/4 \omega_D(\theta)$$

$$\mathcal{H}_{\text{dipolaire}} |\beta_1\rangle |\beta_2\rangle = \omega_D(\theta) (I_{1z} I_{2z} - 1/4 (I_{1+} I_{2-} + I_{1-} I_{2+})) |\beta_1\rangle |\beta_2\rangle$$

$$\text{d'où } \langle \beta_1 | \langle \beta_2 | \mathcal{H}_{\text{dipolaire}} | \beta_1 \rangle | \beta_2 \rangle = 1/4 \omega_D(\theta)$$

$$\frac{1}{\sqrt{2}} \{ \langle \alpha_1 | \langle \beta_2 | + \langle \beta_1 | \langle \alpha_2 | \} \mathcal{H}_{\text{dip.}} \frac{1}{\sqrt{2}} \{ | \alpha_1 \rangle | \beta_2 \rangle + | \beta_1 \rangle | \alpha_2 \rangle \} = -\frac{1}{2} \omega_D(\theta)$$

Les transitions induites par un champ radiofréquence n'apparaîtront qu'entre les niveaux d'énergie de l'état triplet $S = 1$. Ces transitions correspondent à $\Delta m_s = \pm 1$. Les énergies associées aux états propres $|S m_s\rangle$ des deux spins I_1 et I_2 sont:

$$E_{|11\rangle} = -\omega_0 + \frac{1}{4} \omega_D(\theta)$$

$$E_{|10\rangle} = -\frac{1}{2} \omega_D(\theta)$$

$$E_{|1-1\rangle} = \omega_0 + \frac{1}{4} \omega_D(\theta)$$

Nous pouvons alors écrire la matrice du Hamiltonien total pour les deux spins I_1 et I_2 dans la base $|S m_s\rangle$

$$\mathcal{H}_{\text{Total}} = \begin{matrix} \langle 11 | \\ \langle 10 | \\ \langle 1-1 | \\ \langle 00 | \end{matrix} \begin{bmatrix} |11\rangle & |10\rangle & |1-1\rangle & |00\rangle \\ \left[\begin{array}{cccc} -\omega_0 + \frac{1}{4} \omega_D(\theta) & 0 & 0 & 0 \\ 0 & -\frac{1}{2} \omega_D(\theta) & 0 & 0 \\ 0 & 0 & \omega_0 + \frac{1}{4} \omega_D(\theta) & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 \end{array} \right] \end{bmatrix}$$

Annexe I.2 L'interaction dipolaire: une interaction tensorielle dipôle-dipôle

A I.2.1 Définition

La description quantique de l'interaction dipolaire entre deux moments magnétiques \mathbf{m}_j et \mathbf{m}_k , dans le champ magnétique externe \mathbf{B}_0 (Figure I.4), est décrite par le Hamiltonien d'interaction dipolaire $\mathcal{H}_{\text{dipolaire}}$.

Avec $\mathbf{m}_j = \gamma_j \hbar \mathbf{I}_j$ et $\mathbf{m}_k = \gamma_k \hbar \mathbf{I}_k$ nous avons:

$$\mathcal{H}_{\text{dipolaire}} = \hbar \omega_D \mathbf{I}_j \cdot \overline{\overline{\mathbf{D}}} \cdot \mathbf{I}_k$$

$$\text{avec } \omega_D = \frac{\mu_0}{4\pi} \frac{\gamma_j \gamma_k \hbar}{r^3}$$

où $\overline{\overline{\mathbf{D}}}$ représente le tenseur d'ordre 2 de l'interaction dipolaire.

L'interaction dipolaire, comme toutes les interactions internes (CSA, quadrupolaire, couplage scalaire J), est une interaction tensorielle qui peut être complètement caractérisée par 7 grandeurs.

(i) L'intensité de l'interaction

Le couplage dipolaire est fonction des rapports gyromagnétiques γ_j et γ_k des noyaux, et des variables spatiales (r , θ) définissant la longueur et la position des vecteurs internucléaires \mathbf{r} par rapport au champ magnétique externe \mathbf{B}_0 (Figure I.4).

$$\text{avec } \omega_D(\theta) = \frac{\mu_0 \gamma_j \gamma_k \hbar}{4\pi r^3} (1 - 3 \cos^2 \theta)$$

(ii) *Les trois valeurs principales du tenseur d'interaction dans son référentiel d'axes propres*

Soit (O X, Y, Z) le référentiel du laboratoire où le champ magnétique externe \mathbf{B}_0 est aligné selon l'axe (OZ), il existe un référentiel où le tenseur $\overline{\overline{D}}$ est diagonal: c'est le référentiel d'axes propres du tenseur. Dans ce référentiel (O x, y, z), l'interaction dipolaire est de symétrie axiale ($\eta = 0$): le vecteur \mathbf{r} est aligné selon la direction de (Oz).

$$\text{Dans son référentiel d'axes propres } \overline{\overline{D}} = \begin{pmatrix} D_{xx} & 0 & 0 \\ 0 & D_{yy} & 0 \\ 0 & 0 & D_{zz} \end{pmatrix}$$

Dans ce référentiel les valeurs principales du tenseur, D_{xx} , D_{yy} et D_{zz} sont telles que:

$$R = \frac{1}{3} \text{tr } \overline{\overline{D}} = 0$$

$$\delta = D_{zz} - R \quad \text{paramètre d'anisotropie}$$

$$\eta = \frac{D_{yy} - D_{xx}}{\delta} = 0 \quad \text{paramètre d'asymétrie}$$

$$\text{avec la convention } |D_{zz} - R| \geq |D_{yy} - R| \geq |D_{xx} - R|$$

(iii) *Les 3 angles d'Euler $\Omega = (\alpha, \beta, \gamma)$ qui orientent le référentiel d'axes propres (O x, y, z) du tenseur d'interaction par rapport au référentiel du laboratoire (O X, Y, Z).*

Le référentiel (O X, Y, Z) est le référentiel du laboratoire. Pour comprendre le comportement des Hamiltoniens (sous l'effet de rotation par exemple), il est nécessaire de les exprimer dans le référentiel du laboratoire.

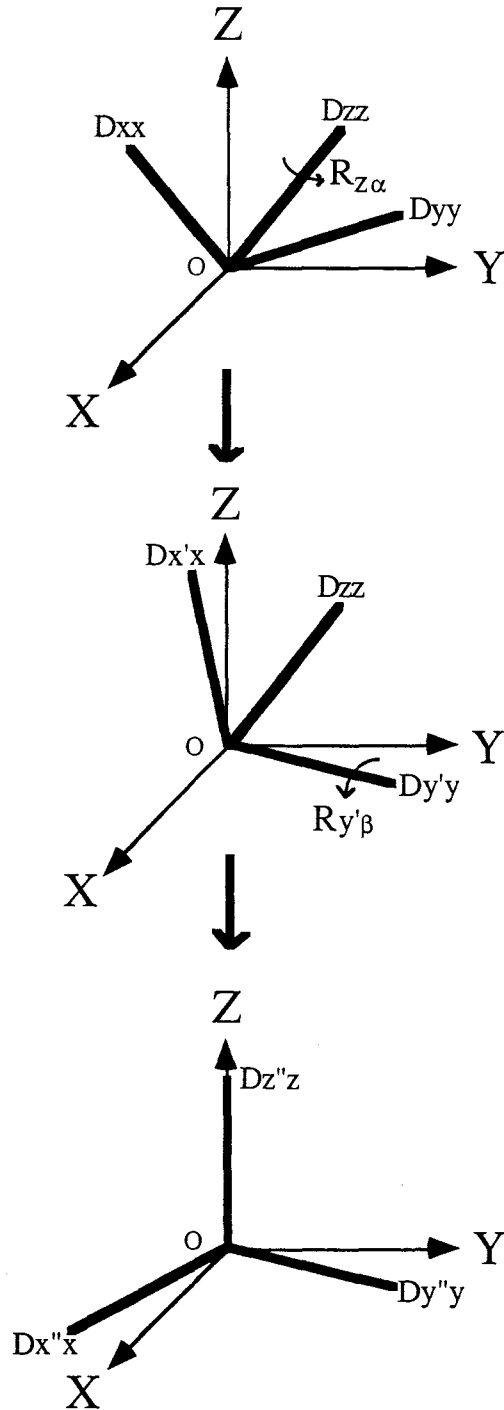


Figure A.I.2.1

Pour passer du référentiel d'axes propres au référentiel du laboratoire, trois rotations suivant les angles d'Euler $\Omega = (\alpha, \beta, \gamma)$ vont être nécessaires. Pour l'interaction dipolaire, du fait de la symétrie axiale dans le référentiel d'axes propres (O, x, y, z) deux rotations $R_{z, \alpha}$ et $R_{y', \beta}$ vont être suffisantes pour faire coïncider l'axe (Oz) du référentiel d'axes propres à l'axe (OZ) du référentiel du laboratoire (Figure A.I.2.1).

A I.2.2 Expression du Hamiltonien d'interaction dipolaire dans le référentiel du laboratoire

Soient deux moments magnétiques nucléaires $\mathbf{m}_j = \gamma_j \hbar \mathbf{I}_j$ et $\mathbf{m}_k = \gamma_k \hbar \mathbf{I}_k$ associés aux spins nucléaires \mathbf{I}_j et \mathbf{I}_k . Le Hamiltonien d'interaction dipolaire dans le référentiel d'axes propres (RAP) de $\overline{\mathbf{D}}$ s'écrit:

$$\mathcal{H}_{\text{dipolaire}}^{\text{RAP}} = \hbar \omega_D \mathbf{I}_j \cdot \overline{\mathbf{D}} \cdot \mathbf{I}_k$$

$$\text{avec } \omega_D = \frac{\mu_0}{4\pi} \frac{\gamma_j \gamma_k \hbar}{r^3}$$

Cette expression dans le référentiel du laboratoire devient

$$\mathcal{H}_{\text{dipolaire}}^{\text{Lab.}} = \hbar \omega_D \mathbf{I}_j \cdot R_{y', \beta} \cdot R_{z, \alpha} \cdot \overline{\mathbf{D}} \cdot R_{z, \alpha}^{-1} \cdot R_{y', \beta}^{-1} \cdot \mathbf{I}_k$$

Ces deux expressions du Hamiltonien dipolaire sont en fait égales car ils représentent la même grandeur physique.

Il existe une autre manière d'effectuer ces deux rotations pour passer du référentiel d'axes propres (O x, y, z) du tenseur $\overline{\mathbf{D}}$ au référentiel du laboratoire (O X, Y, Z). En utilisant les angles d'Euler $\Omega = (\alpha, \beta, \gamma)$ et les matrices de rotation de Wigner $\mathcal{D}_{m'm}^2(\alpha, \beta, \gamma)$ (Edmonds, 1957), on

parvient à faire coïncider l'axe principal (O z) de $\overline{\overline{D}}$ à l'axe (O Z) du référentiel du laboratoire (Figure A.I.2.1). Comme deux rotations suffisent, et du fait de la symétrie axiale du tenseur $\overline{\overline{D}}$ dans le référentiel (O x, y, z), les matrices de rotation de Wigner s'écrivent $\mathcal{D}_{m'm}^2(\alpha, \beta, \gamma=0)$.

Il est plus commode de comprendre l'effet de rotation par exemple sur un Hamiltonien lorsque celui-ci est exprimé dans le référentiel du laboratoire sous la forme d'une décomposition en composantes irréductibles d'opérateurs tensoriels sphériques notés T_{Lm} et $R_{Lm}(\theta, \varphi)$ (Haeberlen, 1976; Gerstein & Dybowski, 1985; Edmonds, 1957).

$$\mathcal{H}_\lambda = C_\lambda \sum_L \sum_{m=-L}^L (-1)^m R_{Lm}^\lambda(\theta, \varphi) T_{Lm}^\lambda$$

où $\lambda =$ Dipolaire, CSA, Quadrupolaire, J

T_{Lm} et $R_{Lm}(\theta, \varphi)$ sont les composantes des opérateurs tensoriels irréductibles dans l'espace des spins et dans l'espace réel respectivement. $R_{Lm}(\theta, \varphi)$ est exprimé dans le référentiel du laboratoire, à l'aide des matrices de rotation de Wigner, en fonction de ses composantes ρ_{Lm}^λ dans le référentiel d'axes propres:

$$R_{Lm}^{\lambda, \text{Lab}}(\theta, \varphi) = \sum_{m'} \mathcal{D}_{m'm}^2(\alpha, \beta, 0) \rho_{Lm'}^\lambda$$

et

$$R_{Lm}^{\lambda, \text{RAP}}(\theta, \varphi) = \rho_{Lm}^\lambda$$

Les composantes ρ_{Lm} de $R_{Lm}(\theta, \varphi)$ sont liées aux valeurs propres du tenseur d'interaction.

L'interaction dipolaire est de symétrie axiale, ce qui va réduire toutes les composantes ρ_{Lm} , où $-2 \leq m \leq 2$, à être nulles sauf ρ_{20} .

Nous avons

$$\rho_{00} = \frac{1}{3} \text{tr } \bar{D} = 0$$

$$\rho_{1m} = 0 \quad \text{pour tout } m$$

$$\rho_{20} = \sqrt{\frac{3}{2}} \delta = \sqrt{\frac{3}{2}} \left(D_{zz} - \frac{1}{3} \text{tr } \bar{D} \right) = \sqrt{\frac{3}{2}} r_{jk}^{-3}$$

$$\rho_{2+/-1} = 0$$

$$\rho_{2+/-2} = \frac{1}{2} \eta \delta = 0$$

où r_{jk} représente la distance entre deux dipôles magnétiques \mathbf{m}_j et \mathbf{m}_k .

En remplaçant ρ_{20} dans l'expression de $R_{Lm}(\theta, \varphi)$

$$R_{Lm}(\theta, \varphi) = \sum_{m'} \mathcal{D}_{m' m}^L(\alpha, \beta, 0) \rho_{L m'}$$

nous obtenons

$$R_{2m}(\theta, \varphi) = \mathcal{D}_{0 m}^2(\alpha, \beta, 0) \rho_{20} = \mathcal{D}_{0 m}^2(\alpha, \beta, 0) \sqrt{\frac{3}{2}} r_{jk}^{-3}$$

d'où l'expression du Hamiltonien d'interaction dipolaire dans le référentiel du laboratoire

$$\mathcal{H}_{\text{dipolaire}}^{\text{Lab.}} = \sqrt{\frac{3}{2}} \frac{\gamma_j \gamma_k \hbar}{r^3} \sum_{m=-2}^2 (-1)^m T_{2m} \mathcal{D}_{0m}^2(\alpha, \beta, 0)$$

En effectuant la somme et en introduisant les opérateurs tensoriels sphériques T_{2m} (Annexe A I.3.1) associés aux spins I_j et I_k et les matrices de rotation de Wigner \mathcal{D}_{0m}^2 (Annexe A I.3.2) associées à $\Omega = (\alpha, \beta, 0)$, nous obtenons l'expression du Hamiltonien d'interaction dipolaire dans le référentiel du laboratoire. Cette expression est exactement celle que l'on obtient lorsque l'on fait le changement des coordonnées cartésiennes en coordonnées sphériques pour le Hamiltonien dipolaire (Figure I.4).

$$\mathcal{H}_{\text{dipolaire}}^{\text{Lab.}} = \hbar \omega_D (A + B + C + D + E + F)$$

Bien que ce résultat puisse être obtenu plus facilement (voir § B.3.2.3), la décomposition du Hamiltonien dipolaire en composantes irréductibles d'opérateurs tensoriels sphériques sera très utile pour exprimer le Hamiltonien dipolaire sous la rotation à l'angle magique.

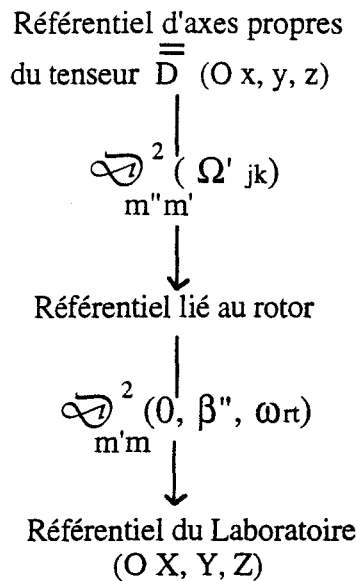
A I.2.3 Expression du Hamiltonien d'interaction dipolaire sous la rotation à l'angle magique

Deux changements de référentiel vont être nécessaires pour exprimer le Hamiltonien d'interaction dipolaire dans le référentiel du laboratoire lorsque le rotor est en rotation à la vitesse ω_r autour d'un axe décalé d'un angle β'' par rapport à \mathbf{B}_0 (Figure I.10).

Un premier changement de référentiel associé aux angles d'Euler $\Omega'_{jk} = (\alpha'_{jk}, \beta'_{jk}, \gamma'_{jk})$ est nécessaire pour passer du référentiel d'axes propres de $\overline{\mathbf{D}}$ au référentiel lié au rotor.

Le second changement de référentiel associé aux angles d'Euler $\Omega'' = (0, \beta'', \omega_r t)$ permettra de passer du référentiel lié au rotor en rotation à la vitesse ω_r au référentiel du laboratoire.

En utilisant les matrices de rotations de Wigner (Annexe I.3.2), pour effectuer ces deux changements de référentiel, nous pouvons exprimer le Hamiltonien d'interaction dipolaire en composantes irréductibles d'opérateurs tensoriels sphériques (Annexe I.3.1) (Haeberlen, 1976; Gerstein & Dybowski, 1985) dans le référentiel du laboratoire suivant le principe ci-dessous:



Pour le premier changement de référentiel (référentiel d'axes propres du tenseur $\overline{\overline{D}}$ / référentiel lié au rotor) nous obtenons pour R_{Lm} :

$$R_{Lm}(\text{Rotor}) = \sum_{m''} \mathcal{D}_{m''m}^2(\Omega'_{jk}) \rho_{Lm}^{\text{RAP}}$$

Pour le second changement de référentiel (référentiel lié au rotor / référentiel du laboratoire)

nous avons pour R_{lm} :

$$R_{Lm}(\text{Lab}) = \sum_m \mathcal{D}_{m^2 m}^2(0, \beta'', \omega_r t) R_{Lm'}(\text{Rotor})$$

Finalement pour passer directement du référentiel d'axes propres de \overline{D} au référentiel du laboratoire nous obtenons pour R_{Lm} :

$$R_{Lm}(\text{Lab}) = \sum_{m'} \mathcal{D}_{m^2 m}^2(0, \beta'', \omega_r t) \sum_{m''} \mathcal{D}_{m^2 m''}^2(\Omega_j' k) \rho_{Lm''}^{\text{RAP}}$$

Parmi les invariants ρ_{lm} dans le référentiel d'axes propres de \overline{D} , seul ρ_{20} est non nul. De plus si on ne considère que la partie séculaire du Hamiltonien d'interaction dipolaire, c'est à dire les termes A et B (ces termes sont liés à la forme de raie), on ne prend en compte que le cas $m = 0$. Nous obtenons finalement:

$$R_{20}(\text{Lab}) = \sqrt{\frac{3}{2}} r_{jk}^{-3} \sum_{m'=-2}^2 \mathcal{D}_{m^2 0}^2(0, \beta'', \omega_r t) \mathcal{D}_{0m'}^2(\Omega_j' k)$$

avec les matrices de rotation de Wigner (Annexe I.3.2):

$$\mathcal{D}_{\pm 2 0}^2(0, \beta'', \omega_r t) = \sin^2 \beta'' e^{\pm 2i \omega_r t}$$

$$\mathcal{D}_{\pm 1 0}^2(0, \beta'', \omega_r t) = \sin 2\beta'' e^{\pm i \omega_r t}$$

$$\mathcal{D}_{0 0}^2(0, \beta'', \omega_r t) = \frac{3 \cos^2 \beta'' - 1}{2}$$

L'expression générale du Hamiltonien dipolaire dans le référentiel du laboratoire est décrite par l'expression:

$$\mathcal{H}_\lambda = C_\lambda \sum_L \sum_{m=-L}^L (-1)^m R_{L\bar{m}}^\lambda(\theta, \varphi) T_{Lm}^\lambda$$

En ne conservant que la partie séculaire du Hamiltonien dipolaire, on ne retient que le terme R_{20} . Sous rotation (ω_r) le long de l'axe faisant un angle β'' avec le champ externe \mathbf{B}_0 (Figure I.10), la partie séculaire du Hamiltonien dipolaire dans le référentiel du laboratoire devient pour un ensemble de spins j:

$$\mathcal{H}_{\text{dipolaire}}^{\text{Lab.}} = \sum_{j < k} \gamma_j \gamma_k f_i T_{20}^{jk} R_{20}^{jk}(\text{Lab})$$

En introduisant les expressions de R_{20} et de T_{20} (Annexe I.3.1), nous obtenons finalement:

$$\begin{aligned} \mathcal{H}_{\text{dipolaire}}^{\text{Lab.}}(t) = \sum_{j < k} \frac{\gamma_j \gamma_k f_i}{2 I_{jk}^3} (3 I_{jz} I_{kz} - \mathbf{I}_j \cdot \mathbf{I}_k) \left\{ \frac{3 \cos^2 \beta'' - 1}{2} \frac{3 \cos^2 \beta_{jk}' - 1}{2} \right. \\ \left. + \mathcal{D}_{\pm 1 0}^2(\Omega_{jk}') \sin 2\beta'' e^{\pm i \omega_r t} \right. \\ \left. + \mathcal{D}_{\pm 2 0}^2(\Omega_{jk}') \sin^2 \beta'' e^{\pm 2i \omega_r t} \right\} \end{aligned}$$

Cette expression représente la partie séculaire du Hamiltonien dipolaire pour un ensemble de spins j en rotation rapide (ω_r) le long d'un axe faisant un angle β'' avec le champ externe \mathbf{B}_0 .

Annexe A I.3.1 Composantes des opérateurs tensoriels irréductibles de l'espace des spins T_{Lm}

pour l'interaction dipolaire (Haeberlen, 1976; Gerstein & Dybowski, 1985)

$$\begin{array}{cccc}
 T_{00} & T_{20} & T_{2\pm 1} & T_{2\pm 2} \\
 \mathbf{I}_j \cdot \mathbf{I}_k & \frac{1}{\sqrt{6}} [3 I_0^j I_0^k - \mathbf{I}_j \cdot \mathbf{I}_k] & \frac{1}{\sqrt{2}} [I_{\pm 1}^j I_0^k + I_0^j I_{\pm 1}^k] & I_{\pm 1}^j I_{\pm 1}^k
 \end{array}$$

avec $I_0 = I_z$, $I_{\pm} = I_x \pm i I_y$ et $I_{\pm 1} = -/+ \frac{1}{\sqrt{2}} I_{\pm}$

Annexe A I.3.2 Matrices de rotation de Wigner $D^2_{m'm}(\alpha, \beta, \gamma)$ (Edmonds, 1957)

	m				
m'	2	1	0	-1	-2
2	$\frac{(1 + \cos \beta)^2}{4} e^{2i(\alpha + \gamma)}$	$\frac{1 + \cos \beta}{2} \sin \beta e^{i(2\gamma + \alpha)}$	$\sqrt{\frac{3}{8}} \sin^2 \beta e^{2i\gamma}$	$\frac{1 - \cos \beta}{2} \sin \beta e^{i(2\gamma - \alpha)}$	$\frac{(1 - \cos \beta)^2}{4} e^{2i(\gamma - \alpha)}$
1	$-\frac{1 + \cos \beta}{2} \sin \beta e^{i(2\alpha + \gamma)}$	$\left[\cos^2 \beta - \frac{1 - \cos \beta}{2} \right] e^{i(\alpha + \gamma)}$	$\sqrt{\frac{3}{8}} \sin 2\beta e^{i\gamma}$	$\left[\frac{1 + \cos \beta}{2} - \cos^2 \beta \right] e^{i(\gamma - \alpha)}$	$\frac{1 - \cos \beta}{2} \sin \beta e^{i(\gamma - 2\alpha)}$
0	$\sqrt{\frac{3}{8}} \sin^2 \beta e^{2i\alpha}$	$-\sqrt{\frac{3}{8}} \sin 2\beta e^{i\alpha}$	$\frac{3 \cos^2 \beta - 1}{2}$	$\sqrt{\frac{3}{8}} \sin 2\beta e^{-i\alpha}$	$\sqrt{\frac{3}{8}} \sin^2 \beta e^{-2i\alpha}$
-1	$-\frac{1 - \cos \beta}{2} \sin \beta e^{i(2\alpha - \gamma)}$	$\left[\frac{1 + \cos \beta}{2} - \cos^2 \beta \right] e^{i(\alpha - \gamma)}$	$-\sqrt{\frac{3}{8}} \sin 2\beta e^{-i\gamma}$	$\left[\cos^2 \beta - \frac{1 - \cos \beta}{2} \right] e^{-i(\alpha + \gamma)}$	$\frac{1 + \cos \beta}{2} \sin \beta e^{-i(2\alpha + \gamma)}$
-2	$\frac{(1 - \cos \beta)^2}{4} e^{2i(\alpha - \gamma)}$	$-\frac{1 - \cos \beta}{2} \sin \beta e^{i(\alpha - 2\gamma)}$	$\sqrt{\frac{3}{8}} \sin^2 \beta e^{-2i\gamma}$	$-\frac{1 + \cos \beta}{2} \sin \beta e^{-i(\alpha + 2\gamma)}$	$\frac{(1 + \cos \beta)^2}{4} e^{-2i(\gamma + \alpha)}$

Annexe I.4 L'interaction d'anisotropie de déplacement chimique: une interaction tensorielle électron-noyau

Chaque noyau est entièrement défini par son tenseur d'anisotropie de déplacement chimique $\overline{\overline{\sigma}}$, par son référentiel d'axes propres et par ses valeurs propres dans ce référentiel. Le tenseur $\overline{\overline{\sigma}}$ est de rang 2 et symétrique ($\sigma_{xy} = \sigma_{yx}$).

Dans son référentiel d'axes propres
$$\overline{\overline{\sigma}} = \begin{pmatrix} \sigma_{11} & 0 & 0 \\ 0 & \sigma_{22} & 0 \\ 0 & 0 & \sigma_{33} \end{pmatrix}$$

$$\sigma_{\text{iso}} = \frac{1}{3} \text{tr } \overline{\overline{\sigma}} = \frac{1}{3} (\sigma_{11} + \sigma_{22} + \sigma_{33}) \quad \text{déplacement chimique isotrope}$$

$$\delta_{\sigma} = \sigma_{33} - \sigma_{\text{iso}} \quad \text{paramètre d'anisotropie}$$

$$\eta_{\sigma} = \frac{\sigma_{22} - \sigma_{11}}{\delta_{\sigma}} \quad \text{paramètre d'asymétrie}$$

avec la convention $|\sigma_{33} - \sigma_{\text{iso}}| \geq |\sigma_{22} - \sigma_{\text{iso}}| \geq |\sigma_{11} - \sigma_{\text{iso}}|$

Suivant l'orientation du référentiel d'axes propres du tenseur $\overline{\overline{\sigma}}$ par rapport à la direction du champ magnétique externe \mathbf{B}_0 , un déplacement chimique sera observé. On parle d'anisotropie de déplacement chimique lorsque pour une direction d'observation donnée, c'est à dire la direction du champ externe \mathbf{B}_0 , plusieurs déplacements chimiques existent pour un même noyau.

Dans le référentiel du laboratoire, le Hamiltonien exprimant pour un ensemble de spins nucléaires j l'écrantage par les électrons qui entourent le spin nucléaire j s'écrit:

$$\mathcal{H}_{\sigma}^{\text{Lab}} = \sum_j \gamma_j \text{fi } \mathbf{I}_j \cdot \overline{\overline{\sigma}} \cdot \mathbf{B}_0$$

En ne considérant que la partie séculaire du Hamiltonien d'anisotropie de déplacement chimique (liée à la forme de raie), c'est à dire la partie de \mathcal{H}_σ qui commute avec le Hamiltonien d'interaction Zeeman, nous obtenons pour le spin nucléaire j:

$$\mathcal{H}_\sigma^{\text{Lab}} = \gamma_j \text{fi } I_{jz} \sigma_{zz} B_0$$

De la même manière que le Hamiltonien d'interaction dipolaire (Annexe I.2), le Hamiltonien d'anisotropie de déplacement chimique peut s'exprimer dans le référentiel du laboratoire sous la forme d'une décomposition en composantes irréductibles d'opérateurs tensoriels sphériques (Haeberlen, 1976; Gerstein & Dybowski, 1985), et nous obtenons:

$$\mathcal{H}_\sigma^{\text{Lab}} = \gamma_j \text{fi } I_{jz} \left\{ \sigma_{\text{iso}} + \frac{\delta_\sigma}{2} (3 \cos^2 \beta - 1) - \eta_\sigma \sin^2 \beta \cos 2\alpha \right\}$$

Annexe I.5 Tables des déplacements chimiques ^1H et ^{13}C des échantillons de peptidyl-résines durant la synthèse de la "séquence difficile"

(Résine Wang) -Ile- NH_2 (DMF- d_7)

Résidu	H^{N}	C^{α}	C^{β}	Autres
Ile 10	NH_2 nd	59.53 (3.28)	39.68 (1.66)	C γ 24.87 (1.45 1.16); C $^{\text{m}}\gamma$ 25.93 (0.87); C $^{\delta}$ 11.74 (0.80); CO 175.94

(Résine Wang) -Ile-Val- NH_2 (DMF- d_7)

Résidu	H^{N}	C^{α}	C^{β}	Autres
Ile 10	8.23	56.73 (4.49)	37.74 (1.90)	C γ 25.41 (1.43 1.19); C $^{\text{m}}\gamma$ 15.83 (0.88); C $^{\delta}$ 11.54 (0.82); CO 175.28
Val 9	NH_2 nd	60.51 (3.21)	32.10 (2.10)	C γ 19.78 16.93 (0.95 0.85); CO 172.14

(Résine Wang) -Ile-Val-Ser(OtBu)- NH_2 (DMF- d_7)

Résidu	H^{N}	C^{α}	C^{β}	Autres
Ile 10	8.38	55.95 (4.41)	37.20 (1.87)	C γ 25.53 (1.45 1.26); C $^{\text{m}}\gamma$ 15.73 (0.88); C $^{\delta}$ 11.52 (0.81)
Val 9	8.14	57.39 (4.57)	32.47 (2.10)	C γ 17.90 19.53 (0.90*)
Ser 8	NH_2 nd	57.17 (3.39)	64.77 (3.49 3.59)	

(Résine Wang) -Ile-Val-Ser(OtBu)-Gly-NH₂ (DMF-*d*7)

Résidu	H ^N	C ^α	C ^β	Autres
Ile 10	8.30	27.37 (4.41)	37.25 (1.89)	C ^γ 25.54 (1.46 1.26); C ^{mγ} 15.78 (0.89); C ^δ 11.54 (0.82)
Val 9	7.70	57.84 (4.56)	32.10 (2.10)	C ^γ 18.08 19.48 (0.91*)
Ser 8	8.26	53.62 (4.54)	53.62 (3.74 3.50)	
Gly 7	NH ₂ nd	45.31 (3.28*)		

(Résine Wang) -Ile-Val-Ser(OtBu)-Gly-Arg(Pmc)-NH₂ (DMF-*d*7)

Résidu	H ^N	C ^α	C ^β	Autres
Ile 10	8.26	57.33 (4.40)	37.22 (1.88)	C ^γ 25.50 (1.46 1.24); C ^{mγ} nd (0.88); C ^δ 11.46 (0.82)
Val 9	7.73	57.93 (4.53)	31.92 (2.11)	C ^γ 19.44 18.05 (0.91*)
Ser 8	8.06	54.08 (4.57)	62.35 (3.69 3.52)	
Gly 7	8.48	42.88 (3.98*)		
Arg 6	NH ₂ nd	55.20 (3.46)	29.75 (1.81*)	C ^γ 26.17 (1.61*); C ^δ 40.91 (3.21*); NH ^ε 7.01

(Résine Wang) -Ile-Val-Ser(OtBu)-Gly-Arg(Pmc)-Ac (DMF-*d*7)

Résidu	H ^N	H ^α	H ^β	Autres
Ile 10	8.23	4.40	1.88	H ^γ 1.45 1.24; H ^{mγ} 0.88; H ^δ 0.82
Val 9	7.69	4.52	2.12	H ^γ 0.91*
Ser 8	7.94	4.55	3.66 3.55	
Gly 7	8.45	3.92*		
Arg 6	8.19	4.36	1.84 1.63	H ^γ 1.63*; H ^δ 3.21*; NH ^ε 6.84

(Résine Wang) -Ile-Val-Ser(OtBu)-Gly-Arg(Pmc)-Fmoc (DMF-*d*7)

Résidu	H ^N	H ^α	H ^β	Autres
Ile 10	8.24	4.18	1.88	H ^γ 1.44 1.25; H ^{mγ} 0.87; H ^δ 0.80
Val 9	7.69	4.55	2.11	H ^γ 0.91*
Ser 8	7.97	4.57	3.65 3.52	
Gly 7	8.41	3.98*		
Arg 6	7.66	4.24	1.91 1.67	H ^γ 1.67*; H ^δ 3.25*; NH ^ε 6.86 groupe Fmoc: 7.90 7.74 7.42 7.33

(Résine Wang) -Ile-Val-Ser(OtBu)-Gly-Arg(Pmc)-Ala-NH₂ (DMF-*d*7)

Résidu	H ^N	H ^α	H ^β	Autres
Ile 10	8.24	4.39	1.88	H ^γ 1.43 1.21; H ^{mγ} 0.87; H ^δ 0.81
Val 9	7.71	4.51	2.11	H ^γ 0.90*
Ser 8	7.99	4.54	3.66 3.53	
Gly 7	8.44	3.94*		
Arg 6	8.27	4.43	1.70 1.58	H ^γ 1.58*; H ^δ 3.20*; NH ^ε 6.98
Ala 5	NH ₂ nd	3.55	1.28	

(Résine Wang) -Ile-Val-Ser(OtBu)-Gly-Arg(Pmc)-Ala-Glu(OtBu)-NH₂ (DMF-*d*7)

Résidu	H ^N	C ^α	C ^β	Autres
Ile 10	8.27	57.32 (4.41)	37.23 (1.89)	C ^γ 25.52 (1.45 1.22); C ^{mγ} nd (0.89); C ^δ 11.48 (0.83)
Val 9	7.78	57.93 (4.53)	31.93 (2.11)	C ^γ 19.44 18.45 (0.91*)
Ser 8	7.99	54.07 (4.57)	62.39 (3.66 3.54)	
Gly 7	8.28	42.93 (3.95*)		
Arg 6	8.22	53.29 (4.43)	29.75 (1.90 1.67)	C ^γ 25.96 (1.60*); C ^δ 40.80 (3.20*); NH ^ε 6.84
Ala 5	8.27	49.06 (4.48)	18.41 (1.35)	
Glu 4	NH ₂ nd	54.91 (3.34)	31.93 (1.99 1.72)	C ^γ 32.10 (2.38*)

(Résine Wang) -Ile-Val-Ser(OtBu)-Gly-Arg(Pmc)-Ala-Glu(OtBu)-Gly-Glu(OtBu)-NH₂(DMF-*d*7 / DMSO-*d*5) (80% / 20%, v / v)

Résidu	H ^N	C ^α	C ^β	Autres
Ile 10	8.24	57.18 (4.40)	37.06 (1.89)	C ^γ 25.42 (1.46 1.25); C ^{mγ} 17.64 (0.88); C ^δ 11.46 (0.83)
Val 9	7.73	57.83 (4.52)	31.81 (2.11)	C ^γ 18.19 19.41 (0.92*)
Ser 8	7.94	53.90 (4.56)	62.33 (3.66 3.54)	
Gly 7	8.19	42.91(3.94*)		
Arg 6	7.97	53.15 (4.38)	29.62 (1.91*)	C ^γ 25.81 (1.68 1.60); C ^δ 40.65 (3.21*); NH ^ε (6.82)
Ala 5	8.24	49.36 (4.41)	17.64 (1.37)	
Glu 4	8.33	52.87 (4.44)	27.73 (2.11 1.94)	C ^γ 31.81 (2.39*)
Gly 3	8.44	42.91 (3.95*)		
Glu 2	NH ₂ nd	54.75 (3.38)	30.73 (2.00 1.73)	C ^γ 31.81 (2.39*)

(Résine Wang) -Ile-Val-Ser(OtBu)-Gly-Arg(Pmc)-Ala-Glu(OtBu)-Gly-Glu(OtBu)-Thr(OtBu)-NH₂(DMF-*d*7 / DMSO-*d*5) (60% / 40%, v / v)

Résidu	H ^N	H ^α	H ^β	Autres
Ile 10	8.27	4.35	1.87	H ^γ 1.58 1.26; H ^{mγ} 0.87; H ^δ 0.83
Val 9	7.78	4.49	2.05	H ^γ 0.89*
Ser 8	7.98	4.56	3.59 3.50	
Gly 7	8.17	3.90*		
Arg 6	7.99	4.38	1.85 1.64	H ^γ 1.56*; H ^δ 3.17*; NH ^ε 6.75
Ala 5	8.14	4.40	1.33	
Glu 4	8.11	4.40	2.06 1.93	H ^γ 2.35*
Gly 3	8.42	3.87*		
Glu 2	nd	4.40	nd	H ^γ nd
Thr 1	NH ₂ nd	4.06	3.12	H ^γ 1.14

CHAPITRE II

La minimisation de la saturation de l'eau

A. Introduction

Le développement intense en RMN biologique de nouvelles séquences de suppression du signal du solvant traduit le besoin considérable de réduire le signal de l'eau sans altérer les signaux issus de la macromolécule étudiée. Néanmoins, il est reconnu depuis très longtemps qu'une saturation du signal de l'eau va se traduire par un effet de transfert de saturation depuis les protons de l'eau jusqu'aux protons de la macromolécule, qui s'échangent rapidement avec l'eau. Ce transfert de saturation pourra être étendu à tous les autres protons de la macromolécule via le phénomène de diffusion de spin, ou de NOE direct avec l'eau: cela se traduit par une nette diminution de l'intensité de tous les signaux ^1H issus de la macromolécule (Redfield *et al.*, 1975; Guéron *et al.*, 1991; Otting *et al.*, 1991). Cet effet est très important lorsque la macromolécule en solution se trouve à un pH proche de son pH physiologique (7-8). Dans de telles conditions, l'échange entre les protons labiles de la macromolécule et les protons de l'eau est très rapide (Wüthrich, 1986).

Nous comprenons immédiatement l'importance de développer des séquences où le signal de l'eau est supprimé, tout en minimisant la saturation de ce signal afin de réduire au maximum tout phénomène de transfert de saturation.

1. Le signal de l'eau: un problème en RMN biologique

La suppression du signal du solvant, l'eau, en RMN des protéines et des acides nucléiques est un problème majeur. Ceci vient du déséquilibre important existant entre la concentration en ^1H pour l'eau (110 molaires), et la concentration en ^1H de la macromolécule biologique étudiée (quelques millimolaires). Après une simple impulsion (90°), sans suppression du signal du solvant, le seul signal observable est un signal très intense: celui des protons de l'eau.

2. Les méthodes de suppression du signal de l'eau

La méthode qui consiste à présaturer sélectivement à basse puissance le signal de l'eau est la méthode la plus populaire et la plus répandue (Hoult, 1976), mais présente l'inconvénient majeur de saturer le signal de l'eau durant toute l'expérience.



De nombreuses autres techniques de suppression du signal de l'eau ont été développées. Elles sont basées sur la non-excitation du signal de l'eau comme dans la séquence *Jump-Return* (Plateau & Guéron, 1982), sur l'utilisation d'impulsions *spin-lock* pour détruire l'aimantation de l'eau du fait des inhomogénéités de champ radiofréquence (Otting & Wüthrich, 1988; Sodano & Delepierre, 1993), sur l'utilisation de gradients de champ et sur les propriétés de diffusion différentes entre les molécules d'eau et les macromolécules (Van Zijl & Moonen, 1990), ou sur l'utilisation d'impulsions formées sélectives sur l'eau (séquence ''SS'') (Smallcombe, 1993).

Actuellement la méthode la plus couramment utilisée, en raison de la facilité à disposer de gradient de champ sur les spectromètres, est la technique qui combine l'utilisation d'impulsions sélectives sur l'eau et les gradients de champ. La séquence WATERGATE proposée par Piotto en 1992 repose sur ce principe (Piotto *et al.*, 1992). Dans cette séquence, les gradients de champ défocalisent puis refocalisent toutes les aimantations exceptées celles des protons de l'eau (voir § B.1). Elle présente de nombreux avantages par rapport aux autres techniques de suppression d'eau, qui pour la plupart souffrent d'un profil d'excitation non uniforme, d'une distorsion de ligne de base ou d'un degré faible de suppression du signal de l'eau. Récemment une autre séquence, basée sur l'utilisation d'impulsions très sélectives sur l'eau et appliquées de manière successive, et sur l'utilisation de gradients de champ, a été proposée: c'est la séquence WET (Smallcombe *et al.*, 1995). Cette séquence présente un avantage par rapport à la séquence WATERGATE: comme la séquence WET est appliquée durant le délai de relaxation, ou pendant le temps de mélange (NOESY), elle évite la perte de signal due à la relaxation T_2 et à l'évolution du couplage homonucléaire pendant le spin-écho de la séquence WATERGATE. Néanmoins, l'incorporation de ce schéma est inadaptée dans toute expérience où nous désirons suivre l'état de l'aimantation de

l'eau durant l'expérience, afin de la maintenir dans un état non saturé au début de la période d'acquisition.

3. Les impulsions sélectives sur l'eau:

les impulsions *water flip-back*

Les méthodes de suppression du signal du solvant basées sur la non-excitation de l'eau, telles que la séquence *Jump-Return* (Plateau & Guéron, 1982) ou la séquence ''SS'' (Smallcombe, 1993), ne vont pas générer un état saturé pour l'aimantation de l'eau puisque l'eau n'est pas excitée, ainsi tout effet de transfert de saturation est éliminé.

Le problème majeur des autres séquences de suppression du signal de l'eau développées jusqu'à aujourd'hui est la création d'un état complètement saturé ou semi-saturé de l'aimantation de l'eau au début de la période d'acquisition. Du au temps de relaxation longitudinale T_1 très long des protons de l'eau (4 à 5 s) devant celui des protons des macromolécules (~ 1.4 s), et au délai de relaxation entre chaque expérience choisi plus court que le T_1 des protons de l'eau, l'aimantation de l'eau va demeurer dans un état saturé au début chaque expérience.

Les expériences hétéronucléaires

Bax et ses collaborateurs furent les premiers en 1993, à introduire dans des séquences hétéronucléaires des impulsions sélectives sur l'eau, appelées impulsions *water flip-back*. Ces impulsions permettent de suivre exactement l'état de l'aimantation de l'eau au cours de la séquence et de la maintenir dans un état non saturé au début de la période d'acquisition. Ainsi l'utilisation combinée de gradients de champ, pour la sélection des chemins de cohérence, avec la séquence de suppression d'eau WATERGATE associée avec des impulsions *water flip-back*, leur permit d'obtenir un gain en intensité de 20 % sur les pics de corrélation ^1H - ^{15}N dans une expérience HSQC, mais aussi d'augmenter la sensibilité de la mesure quantitative des NOEs ^{15}N - $\{^1\text{H}\}$, et des NOEs entre les protons de l'eau et la macromolécule (Grzesiek & Bax, 1993 (a), (b)). Ces

impulsions *water flip-back*, ont par la suite été incorporées dans de nombreuses séquences hétéronucléaires (Jahnke & Kessler, 1994; Kuboniwa *et al.*, 1994).

Les expériences homonucléaires

Nous allons décrire dans ce chapitre l'incorporation d'impulsions *water flip-back* dans les séquences homonucléaires NOESY (Jeener *et al.*, 1979; Kumar *et al.*, 1980) et TOCSY (Braunschweiler & Ernst, 1983). Ces deux séquences constituent les expériences de base pour la détermination de structure tridimensionnelle de macromolécules biologiques en solution. Les impulsions *water flip-back* nous ont permis de contrôler l'état de l'aimantation de l'eau durant l'expérience, et de la maintenir dans un état proche de son état d'équilibre (le long de l'axe (+z)) au début chaque période d'acquisition et indépendamment de la phase sélectionnée durant la période d'évolution t_1 pour les expériences 2D.

B. Les séquences WATERGATE NOESY et WATERGATE TOCSY avec incorporation d'impulsions *water flip-back*

Nous allons tout d'abord nous intéresser à la séquence de suppression d'eau WATERGATE, et au phénomène de *radiation damping* (Bloembergen & Pound, 1954; Warren *et al.*, 1989; Vlassenbroek, 1993).

1. La méthode de suppression du signal de l'eau WATERGATE

Une des méthodes les plus efficaces et les plus faciles pour supprimer le signal de l'eau est la séquence WATERGATE (Piotto *et al.*, 1992). La force de cette séquence est qu'elle peut être facilement incorporée dans toute expérience homonucléaire ou hétéronucléaire. Cette séquence est symétrique et combine l'utilisation de deux impulsions sélectives (90°) sur l'eau à basse puissance avec deux impulsions de gradient de champ de même force G (Figure II.1).

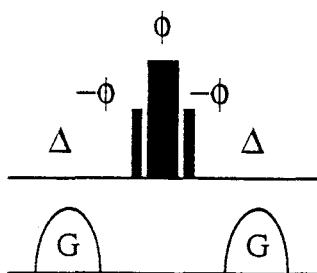


Figure II.1

Le premier gradient de champ G , appliqué durant la période Δ , défocalise toutes les aimantations dans le plan: celles des protons de la macromolécule et celle des protons de l'eau. Les trois impulsions $\{90^\circ(-\phi)$ à basse puissance et sélective sur l'eau $\} - \{180^\circ(+\phi)$ haute puissance $\} - \{90^\circ(-\phi)$ à basse puissance et sélective sur l'eau $\}$ ne vont au total pas perturber l'état de l'aimantation de l'eau (effet 0°), qui sera défocalisée une deuxième fois par le second gradient G durant la période Δ : l'acquisition débute avec une aimantation de l'eau réduite à zéro. Les aimantations de la macromolécule ne ressentiront que l'effet du 180° haute puissance, et seront exactement refocalisées par le second gradient de champ de même force et de même durée que celui qui a été utilisé pour les défocaliser dans la première partie de la séquence. Dans cette séquence, les impulsions sélectives (90°) sur l'eau doivent être soigneusement ajustées en phase et en puissance par rapport à l'impulsion (180°) haute puissance.

La séquence WATERGATE présente deux avantages principaux par rapport à la technique de base de présaturation: (i) il n'y a pas de perte d'information à la fréquence de l'eau en ω_1 , car la suppression du signal de l'eau s'effectue après la période d'évolution t_1 , (ii) l'état de saturation de l'eau n'est pas maintenu durant le délai de relaxation, contrairement à la séquence avec présaturation.

Nous remarquons immédiatement que lorsque l'aimantation de l'eau est alignée le long de l'axe ($+z$) au début de la séquence WATERGATE, cette aimantation ne sera pas perturbée par les

gradients de champ et va demeurer intacte en fin de séquence. C'est cette propriété que nous avons exploitée dans les séquences WATERGATE NOESY et WATERGATE TOCSY pour minimiser l'état de saturation de l'aimantation de l'eau.

2. L'amortissement par rayonnement cohérent ou *radiation damping*

2.1 Définition

Le phénomène de *radiation damping* a été rapporté pour la première fois en 1954 par Bloembergen et Pound. Il prend son origine dans l'interaction entre l'aimantation transversale et le circuit de détection. La base du phénomène repose sur le fait que pour détecter la précession des spins, nous utilisons une bobine placée autour de l'échantillon aux bornes de laquelle apparaît une force électromotrice (f.é.m) $e = -d\phi/dt$. Un dipôle magnétique qui précesse dans le plan transverse va créer dans la bobine de détection une f.é.m, d'où un courant induit $i(t)$. Ce courant va être à l'origine d'un champ magnétique dipolaire, tout à fait analogue au champ magnétique radiofréquence B_1 utilisé pour manipuler l'aimantation, qui aura exactement la fréquence de précession des spins qui l'ont créé. Ce champ dipolaire va agir sur l'aimantation qui l'a créé, en la faisant revenir à sa position d'équilibre selon l'axe (+z), en un temps nettement plus court que le temps de relaxation T_1 . Le phénomène de *radiation damping* n'est pas un phénomène de relaxation. Le retour à l'équilibre par *radiation damping* est un phénomène cohérent ne faisant pas intervenir les interactions avec le réseau, contrairement à la relaxation longitudinale T_1 .

En RMN biologique, le phénomène de *radiation damping* ne concernera pas les protons de la macromolécule (hormis les résonances des protons se trouvant sous la résonance de l'eau), mais les protons abondants à une même fréquence: les ^1H de l'eau. L'aimantation transversale importante de l'eau inévitablement générée durant les périodes d'évolution et de mélange, va induire un courant important dans la bobine de réception. Ce courant va générer un champ dipolaire radiofréquence faible à la fréquence de l'eau, qui va tourner l'aimantation de l'eau vers sa position d'équilibre le

long de l'axe (+z). Le processus de *radiation damping* est représenté schématiquement sur la figure II.2.

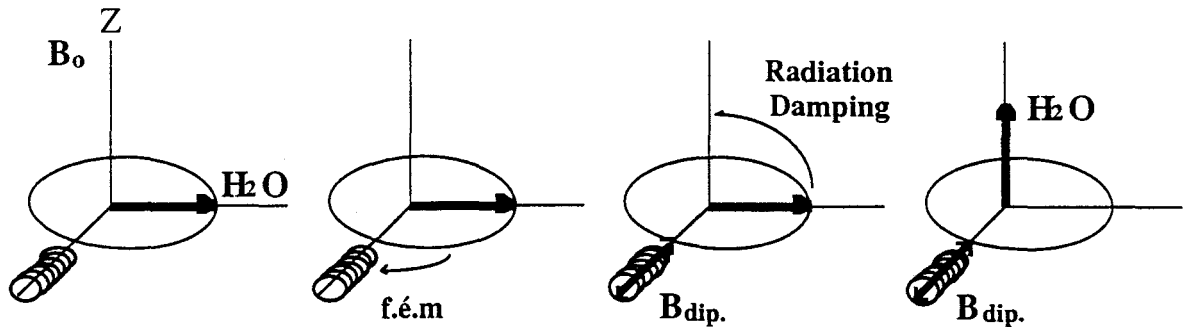


Figure II.2

Le temps caractéristique de *radiation damping* T_{rd} est inversement proportionnel au rapport gyromagnétique du noyau γ , au facteur de qualité Q de la sonde, et à l'aimantation de l'eau à l'équilibre M_0 :

$$T_{rd} \propto (\gamma Q M_0)^{-1}$$

Nous remarquons immédiatement que le phénomène de *radiation damping* prend des proportions très importantes en RMN biologique, où les mesures se font à très haut champ et en utilisant des sondes de mesure de haut facteur de qualité Q . Nous retrouvons également la raison pour laquelle le phénomène de *radiation damping* ne concerne que les spins abondants de l'eau: pour l'aimantation faible de la macromolécule devant celle de l'eau, le temps caractéristique T_{rd} est grand.

A 600 MHz, avec une sonde correctement accordée, le temps caractéristique T_{rd} du retour de l'aimantation de l'eau selon l'axe (+z), est court et est de l'ordre de 50 ms après une impulsion 90° . Ceci va rendre manifestement difficile la manipulation de l'eau dans des expériences qui peuvent

durer plusieurs dixièmes de seconde. Les effets NOE, et d'échange chimique impliquant des molécules d'eau seront perturbés par le *radiation damping*. Durant les périodes d'évolution (t_1 , t_2 , ...), le retour rapide de l'aimantation de l'eau selon l'axe (+z) par *radiation damping*, va élargir dans les domaines (F_1 , F_2 ...) les raies de résonance des protons échangeant avec l'eau, conduisant à une diminution de l'intensité des pics de croisement (Otting, 1991). De plus, durant des impulsions sélectives de plusieurs millisecondes, le *radiation damping* pourra aussi apparaître.

Nous comprenons l'importance de minimiser toute excitation des protons de l'eau, et de maintenir, quand cela est possible durant l'expérience, l'aimantation de l'eau dans un état où elle ne sera pas sujette au *radiation damping*, c'est à dire le long de l'axe (+z).

2.2 Les méthodes pour supprimer les effets du *radiation damping*

Actuellement il existe quatre méthodes pour supprimer les effets du *radiation damping*.

(i) La suppression du *radiation damping* peut être réalisée en introduisant un système d'interrupteur pour le facteur de qualité Q de la sonde qu'il sera alors nécessaire de modifier. La méthode consiste à diminuer le facteur Q durant les périodes de la séquence où le *radiation damping* est gênant (périodes d'évolution sous précession libre), et à garder un facteur Q élevé durant l'acquisition (Anklin *et al.*, 1995).

(ii) La connexion de la bobine radiofréquence à un circuit ouvert en série a été proposée par Guéron (Guéron, 1991). Le courant induit dans un tel circuit par la f.é.m est nul, et par conséquent le *radiation damping* est absent.

(iii) La méthode de compensation consiste à réinjecter en permanence un courant de signe opposé au courant induit dans la bobine de détection par l'aimantation transversale de l'eau (Broekaert & Jeener, 1995; Louis-Joseph *et al.*, 1995). Ainsi, l'effet du *radiation damping* est à tout instant annulé. Ce processus de *feedback* nécessite de développer un système électronique pour détecter, filtrer, modifier la phase et ensuite réinjecter le courant.

(iv) La méthode la plus simple d'accès pour se soustraire des effets du *radiation damping* est l'utilisation d'impulsions de gradient de champ. L'application d'un gradient de champ défocalise l'aimantation transversale de l'eau et interrompt ainsi le mouvement cohérent des spins.

Après une impulsion 180° parfaite, le vecteur de l'aimantation de l'eau est aligné le long de l'axe (-z), il n'y a pas de composante transversale pour l'eau, d'où une absence de phénomène de *radiation damping*. Cependant en pratique après une impulsion 180° , les imperfections de l'impulsion et les inhomogénéités de champ radiofréquence conduisent toujours à la création d'une composante finie transversale de l'eau, et ainsi à l'observation du phénomène de *radiation damping*. Après une impulsion $180^\circ(x)$ (à 600 MHz pour le ^1H), l'aimantation de l'eau se trouve dans le plan (O y, z), la composante transversale maximale est observée après 70 ms. Si un gradient de champ (durée 2 ms, force 10 G.cm^{-1}) est appliqué immédiatement après l'impulsion 180° , le phénomène de *radiation damping* est retardé: la composante transversale maximale est observée après 150 ms.

La situation est bien plus critique lorsque toute l'aimantation de l'eau est transversale: c'est à dire durant les périodes d'acquisition t_1 et t_2 .

Durant la période d'évolution t_1 , la suppression du *radiation damping* est importante pour deux raisons: (i) les résonances des protons $\text{H}\alpha$ sous la résonance de l'eau se trouvent "cachées" en dimension ω_1 par la raie de l'eau élargie suite au *radiation damping*, (ii) les pics de croisement à la fréquence de l'eau sont plus larges et par conséquent moins intenses en présence de *radiation damping*. Par l'incorporation d'un gradient bipolaire faible durant la période d'évolution t_1 , les effets de radiation damping peuvent être supprimés durant cette période d'évolution (Sklenar, 1995).

La suppression du phénomène de *radiation damping* durant la période d'évolution t_2 se pose, lorsque le schéma de suppression du signal de l'eau génère une aimantation non saturée au début de la période d'acquisition. Ce qui est le cas par exemple pour le schéma *Jump-Return* (non excitation du signal de l'eau), contrairement aux schémas de présaturation et WATERGATE qui

réduisent l'aimantation de l'eau à zéro au début de la période d'acquisition. Durant la séquence NOESY *Jump-Return* (Plateau & Guéron, 1982) pour des temps de mélange longs, l'aimantation de l'eau est ramenée le long de l'axe (+z) par le phénomène de *radiation damping* quelque soit la phase de l'incrément t_1 . Ainsi cette aimantation ne sera pas affectée par le schéma *Jump-Return*. Pour des temps de mélange courts (< 100 ms), le problème se posera lorsque l'aimantation se trouve selon l'axe (-z) au début de la période de mélange τ_m . En effet cette aimantation ne sera pas complètement retournée selon l'axe (+z) à la fin de la période τ_m , et sa composante selon (-z) ne sera pas affectée par le schéma *Jump-Return*, et cela conduira à son retour par *radiation damping* durant la période d'acquisition t_2 , d'où une grande quantité d'eau observée. Pour résoudre la suppression du *radiation damping* durant la période d'évolution t_2 , Stonehouse proposa d'incorporer dans la séquence originale NOESY *Jump-Return*, un gradient de champ à la fin de la période de mélange afin de produire une suppression constante du signal de l'eau indépendamment de la durée du temps de mélange et de la phase de l'incrément t_1 (Stonehouse *et al.*, 1994).

3. La séquence *water flip-back* WATERGATE NOESY

Le phénomène de *radiation damping* a été montré comme un phénomène nuisible. A défaut de chercher à le supprimer, pourquoi ne pas retourner le problème et chercher au contraire à travailler avec lui? L'avantage du *radiation damping* est qu'il permet d'aller rapidement vers un état bien défini et reproductible de l'eau. C'est ce caractère reproductible de l'état de l'aimantation de l'eau sous *radiation damping* qui a été exploité de manière constructive durant la période de mélange τ_m de l'expérience NOESY.

3.1 Utilisation d'une impulsion *water flip-back* dans l'expérience homonucléaire NOESY

Use of a water flip-back pulse in the homonuclear NOESY experiment

G. Lippens*, C. Dhalluin and J.-M. Wieruszkeski

CNRS URA 1309, Institut Pasteur de Lille, F-59000 Lille, France

Received 13 January 1995

Accepted 28 February 1995

Keywords: NOE spectroscopy; Water suppression; Water flip-back

Summary

A simple modification to the WATERGATE water suppression scheme [Piotto, M., Saudek, V. and Sklenář, V. (1992) *J. Biomol. NMR*, 2, 661–665] is proposed. Radiation damping is used as an active element during the mixing time of a NOESY experiment, in order to obtain a reproducible state of the water magnetization at the end of the mixing time. Through the use of a water flip-back pulse and a gradient-tailored excitation scheme, we obtain both an excellent water suppression and a water magnetization close to equilibrium at the beginning of the acquisition time. We show experimentally that this modification results in a 20% gain in intensity for all signals when using a relaxation delay of 1.5 s, and also that avoiding a semisaturated state for the water magnetization allows the amide protons as well as other proton resonances to relax to equilibrium with their proper relaxation time.

Most NMR studies of biological macromolecules require the recording of different spectra in aqueous solution, and hence suffer from the problem that the proton concentration is not equally distributed between the 110 M concentration of the water protons and the millimolar concentration of the protons of the molecule under study. A number of selective elimination schemes have been developed, based on the selective presaturation of the water resonance (Hoult, 1976; Hore, 1989), on the use of spin-lock pulses (Messerle et al., 1989; Sodano and Delepierre, 1993), on a selective zero-excitation of the water resonance using jump-return sequences (Plateau and Guéron, 1982; Plateau et al., 1983) or shaped pulses (Smallcombe, 1993), on the difference between the relaxation times of the water and protein proton resonances (Brown et al., 1988) and recently methods involving gradient-enhanced pulse sequences have been proposed based on the different diffusion properties of the solvent and solute (Van Zijl and Moonen, 1990) or on selective defocussing of the undesired resonance (Piotto et al., 1992).

The first method of presaturation has some severe drawbacks, especially when hydrogen exchange is rapid, causing a saturation transfer to certain protons of interest as well as to other protons through the mechanism of spin diffusion (Otting et al., 1991; Liepinsh et al., 1992;

Moy et al., 1992; Henry and Sykes, 1993; Li and Montellione, 1993; Smallcombe, 1993). The sequences based on the use of jump-return or of selective pulses do not excite the water resonance, thereby effectively eliminating all saturation transfer. However, a recent publication described how the combination of radiation damping effects and the need to achieve ω_1 frequency discrimination can lead to a lesser degree of water suppression than hoped for (Stonehouse et al., 1994). These authors therefore modified the original sequence, including a gradient pulse in order to achieve a constant water suppression for all phases and t_1 increments. The use of gradients, combined with selective excitation of the water line, causes a refocusing of all resonances except the water resonance, thereby reducing the water line in a single scan by four to five orders of magnitude (Piotto et al., 1992).

While the latter spectra retain a pure phase character as well as a perfectly flat baseline, the water resonance often remains in a semisaturated state, as for practical reasons the relaxation delay between scans is much shorter than the water T_1 (4–5 s). Several 'water flip-back' sequences have been described (Grzesiek and Bax, 1993a,b; Jahnke and Kessler, 1994; Kuboniwa et al., 1994) in the context of sensitivity enhancement of heteronuclear spectra, where the intensities of the ^1H - ^{15}N correlations suffer

*To whom correspondence should be addressed.

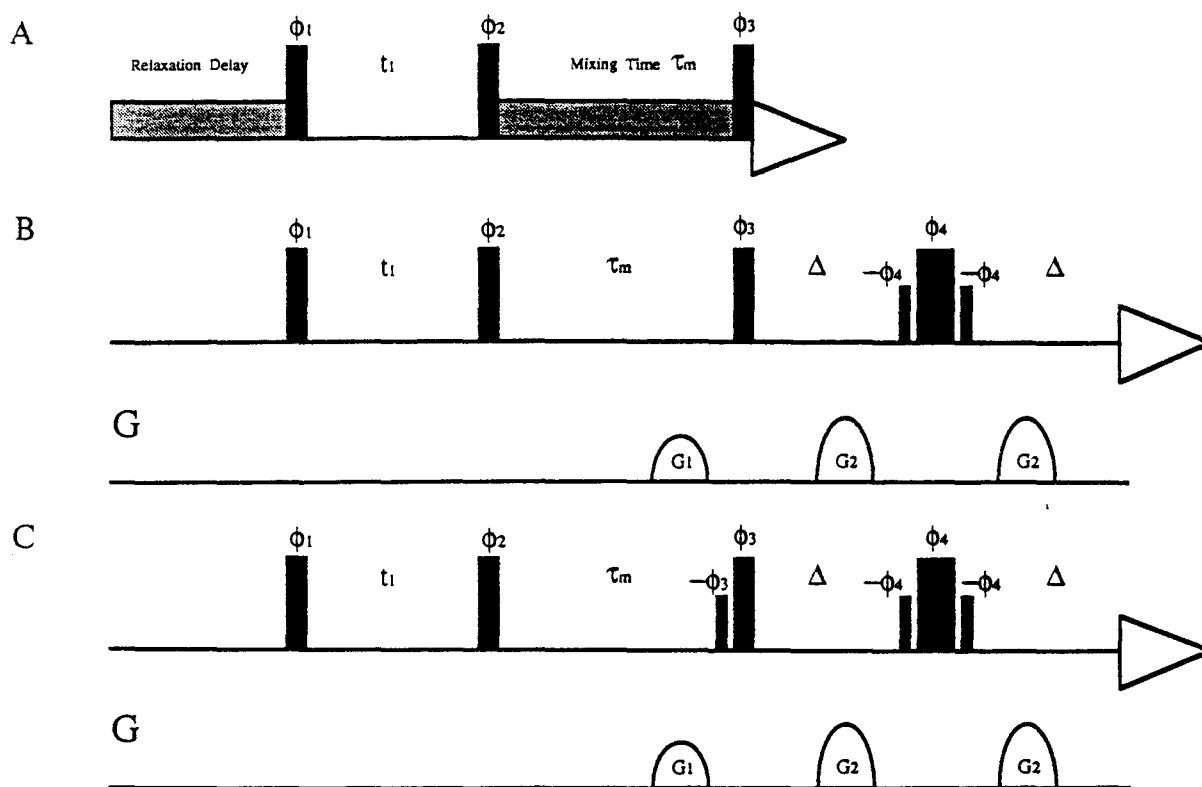


Fig. 1. Pulse sequences of (A) the classic NOESY experiment with low-power presaturation (shaded pulses) during the relaxation delay and the mixing time τ_m ; (B) the WATERGATE NOESY experiment including a gradient G_1 at the end of the mixing time and the gradient-tailored excitation scheme (Piotto et al., 1992); and (C) the water flip-back WATERGATE NOESY experiment, including a selective pulse at the end of the mixing time. Phases used are $\phi_1 = (x, -x, y, -y, -x, x, -y, y)$, $\phi_2 = (x, x, y, y, -x, -x, -y, -y)$, $\phi_3 = (x, x, y, y, -x, -x, -y, -y)$, $\phi_4 = (-x, -x, -y, -y, x, x, y, y)$ and $Acq. = (x, -x, y, -y, -x, x, -y, y)$.

heavily from any form of saturation transfer. However, also in the homonuclear NOESY spectrum (Kumar et al., 1980) rapid to intermediate exchange of the amide protons with the semisaturated water magnetization will lead to a decrease in intensity, especially for such important cross peaks as the $NH-H^\alpha$ correlations. In this communication, we demonstrate that the combination of a water flip-back selective pulse with a water suppression scheme such as the WATERGATE sequence (Piotto et al., 1992) can be used to obtain both a good water suppression and a state of the water magnetization close to equilibrium at the beginning of the acquisition time. Moreover, we will show that the repetition rate in this sequence is solely determined by the T_1 relaxation times of the protein magnetization.

The basic NOESY sequence is shown in Fig. 1A. Water presaturation is applied during both the relaxation delay and the mixing time, leading to a net water magnetization close to zero at the beginning of the acquisition period. The water magnetization relaxes back to its equilibrium value (parallel to the z-axis) during the acquisition time, but the B_1 field during the relaxation delay reduces it back to zero. The resulting signal of a single-scan experiment (where, starting from equilibrium, one probes the water magnetization along the z-axis with a

90° pulse during the acquisition time) shows that water is basically reduced to zero at the beginning of the acquisition time, and relaxes back to its equilibrium value through the mechanism of T_1 relaxation.

In the WATERGATE sequence (Fig. 1B), no presaturation is applied at all, and one has to take into account the phenomenon of radiation damping (Bloembergen and Pound, 1954; Warren et al., 1989; Vlassenbroek, 1993) during the mixing period: depending on the phase cycle, the water magnetization will start along the $-z$ -axis or in the xy -plane, but in both cases, the return of the magnetization to the $+z$ -axis will be much faster than predicted by the relaxation equations. For a 600 MHz spectrometer equipped with a well-tuned high-Q factor probehead, the characteristic times of return to the $+z$ -axis are as short as 50 ms, even after an optimized 180° pulse (Vlassenbroek, 1993; Stonehouse et al., 1994). Therefore, at the end of the mixing time the water vector invariably points to the $+z$ -axis, irrespective of the t_1 increment or the moment in the phase cycle. The small gradient pulse at the end of the mixing time does not affect the water magnetization along the $+z$ -axis, but assures that transverse coherences of the protein magnetization that otherwise need to be cancelled by phase cycling are eliminated in a single scan. The water vector along the $+z$ -axis is then brought into the

xy-plane by the third 90° pulse, after which it is effectively scrambled by the two gradient pulses. The latter act constructively only for a small region around the water resonance, but allow for refocusing of the other resonances due to the echo that is formed by the central 180° pulse. Even though the water suppression of this scheme is excellent, the net water magnetization vector is zero at the beginning of the sequence, and water will return to equilibrium during the acquisition and relaxation delays. Its return is somewhat more rapid than in cases where presaturation is used, which can be attributed to the eventual refocussing of a fraction of the transverse water component, followed by a small amount of radiation damping (M. Piotto, personal communication). However, this return still takes on the order of seconds, and as for considerations of total measuring time the combined duration of acquisition and relaxation delay is usually kept as short as possible, the result is a 'semisaturated' state of the water magnetization.

Radiation damping during the mixing time can be used advantageously when it is recognized that the state of the water magnetization at the end of the mixing time is perfectly reproducible, which is exactly what we hope to

have: all water magnetization is back to its equilibrium state along the +z-axis. If the final 90° pulse is now preceded by a selective pulse of opposite phase (Fig. 1C), the water magnetization after the third 90° pulse will still be along the +z-axis, and the subsequent gradients and $90^\circ(-\phi_4)-180^\circ(\phi_4)-90^\circ(-\phi_4)$ will not affect this magnetization at all. The result is that the acquisition time is started without any transverse water component, but with a longitudinal water component very close to its thermal equilibrium and thus invariant in time. Radiation damping should thus be considered as an active element in this pulse sequence to obtain the desired water magnetization state. This experimental scheme avoids the development of a semisaturated water state and its possible transfer to the protein resonances, and the T_1 of the protein resonances becomes the limiting factor for the choice of the relaxation delay.

For short mixing times, the statements given above are not completely valid, but the gradient at the end of the mixing time does ensure that the only component of the water magnetization that remains just before the third 90° pulse is oriented along the +z-axis. As the slowest phase of radiation damping is the initial buildup of a macro-

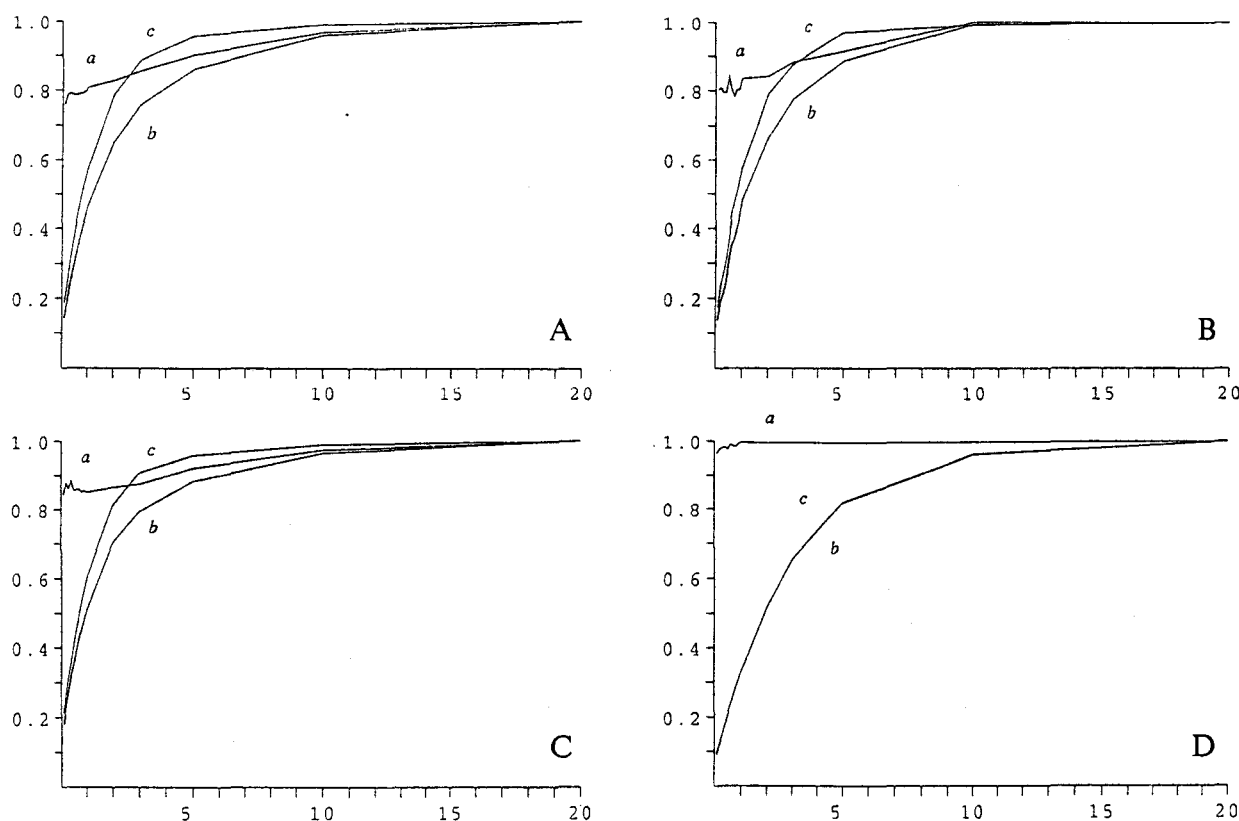


Fig. 2. Intensities of selected resonances in the 1D spectra obtained with the pulse sequences of Fig. 1B (indicated by *b*) and Fig. 1C (indicated by *c*) as a function of the relaxation delay between successive scans and normalized with respect to the intensity obtained with a relaxation delay of 20 s. The ratio *b/c* is indicated by *a*. Resonances are (A) the NH proton at 7.16 ppm; (B) the α resonance at 5.87 ppm; (C) the methyl resonance at -0.64 ppm; and (D) the TMSP resonance at 0 ppm. The experimental conditions are the same as in the legend of Fig. 3. Apparent T_1 values were obtained by fitting an exponential to the intensities obtained at different relaxation delays using the program SNARF (F. van Hoesel, University of Groningen, Groningen, The Netherlands).

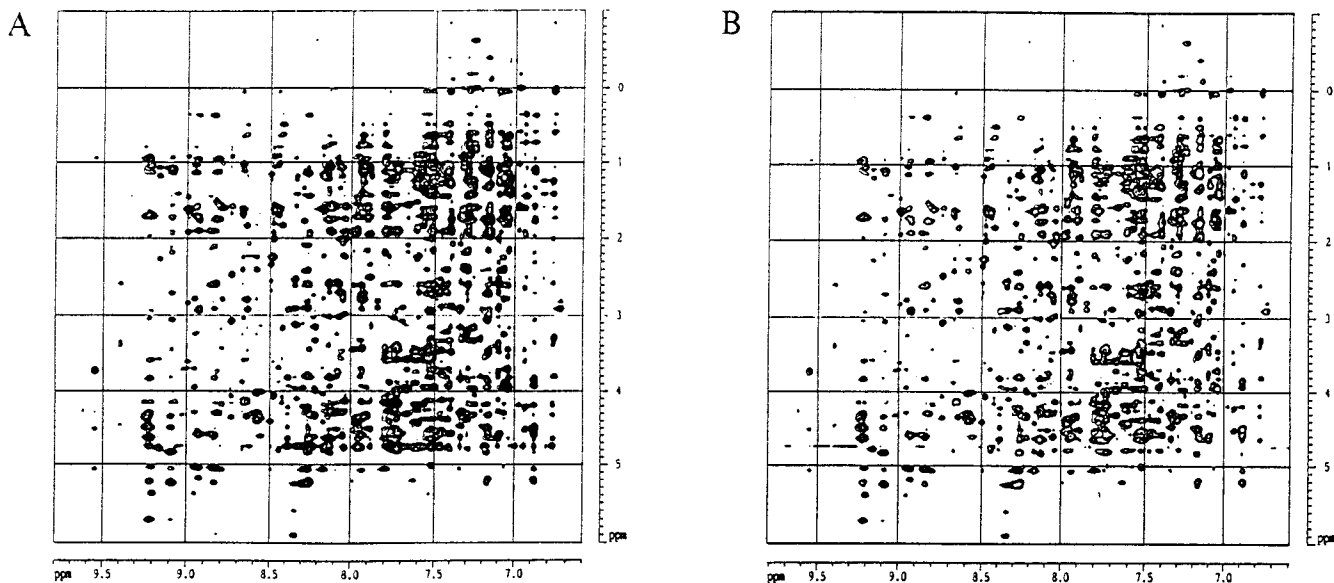


Fig. 3. Phase-sensitive 2D NOESY spectrum of hen egg white lysozyme. Sample conditions : pH 6.7, 30 μ l of a 1 M TMSP solution, and a 2 mM solution of lysozyme in 500 μ l of a 90% H_2O /10% D_2O solution, $T = 35^\circ C$. Spectra were obtained on a Bruker 600 MHz DMX spectrometer operating at 600 MHz and equipped with a triple-resonance self-shielded z-gradient probehead. Gradients have a sine-bell shape, with maximum gradient strengths of 5 G/cm for the gradient in the mixing time (G_1 , Figs. 1B and C) and 15 G/cm for the gradients in the WATERGATE suppression sequence (G_2 , Figs. 1B and C). Selective pulses correspond to a field strength of 160 Hz. The mixing time was 300 ms. Acquisition parameters: spectral width of 14 ppm in both dimensions, 2K complex points in t_2 and 256 complex t_1 increments (States et al., 1982), with 8 scans per increment. (A) 2D spectrum obtained with the pulse sequence of Fig. 1C and a mixing time of 300 ms. (B) Difference spectrum between the 2D spectra obtained with the sequences of Figs. 1C and B. The threshold for spectrum B is a factor of two lower than that for A.

scopic transversal component of the water magnetization, one can enhance its rate either by using a second pulse that is slightly shorter than the real 90° pulse (M. Piotto, personal communication) or by changing the relative phase between the first and second pulses (Zhang et al., 1994). In this manner, an equilibrium magnetization along the +z-axis can be obtained with a mixing time as short as 40 ms, with only a minor loss in signal intensity.

As previous studies have extensively compared the effect of presaturation on the resonance intensities (Smallcombe, 1993), we will only compare spectra recorded with the sequences shown in Figs. 1B and C. We first measured the efficiency of the water flip-back procedure by comparing the water magnetization at the start of the acquisition time of our NOESY sequence to the equilibrium water magnetization (as measured by a single pulse experiment). When carefully optimizing the flip-back pulse (so as to minimize the net flip angle of the combined $90^\circ(-\phi_3)$ soft pulse- $90^\circ(\phi_3)$ hard pulse), we obtained 75% of the full water magnetization at the start of the acquisition time when using a mixing time of 150 ms. The return of the protein signals towards equilibrium can be monitored by recording a number of spectra with relaxation delays varying from 20 s to a value as small as 0.1 s. The results are shown in Figs. 2A-D: as the relaxation delay becomes shorter, the total intensity of the different resonances decreases, but it does so more rapidly when using the sequence of Fig. 1B than the one of Fig. 1C. When we characterize the decrease by an apparent T_1

value, we find values of 2.2 and 1.4 s for amide protons, 2.1 and 1.4 s for α protons and 2.0 and 1.3 s for methyl resonances, where the first value is for the sequence of Fig. 1B and the second for the sequence of Fig. 1C. As a control, Fig. 2D shows the evolution of the TMSP resonance, which is characterized by an identical T_1 value of 3.0 s for both spectra. The uniform values for the relaxation rates of the different protons in the experiment of Fig. 1C can be understood as the effect of spin diffusion (Kalk and Berendsen, 1976), and are compatible with the values we expect for a protein the size of lysozyme. In the experiment of Fig. 1B, however, the buildup of a semi-saturated state, even in the absence of any presaturation, combined with rapid chemical exchange of some amide protons with water protons due to the high pH (6.7) of the sample, yields apparent T_1 values that are somewhere between those of the protein protons and that of the water magnetization. The effect is of equal magnitude for amide and α protons, and slightly weaker for methyl protons.

The 2D performance of sequence 1C is shown in Fig. 3A. The relaxation delay was set to 1.5 s, which is a typical value for experiments in our laboratory. The water suppression is excellent, due to the gradient-tailored WATERGATE excitation. From Fig. 2, we expect that the intensities involving NH and/or α protons will be smaller by approximately 20% when omitting the selective 90° water flip-back pulse. Figure 3B shows the difference spectrum between the spectra of Fig. 3A and the spec-

trum obtained by the regular WATERGATE sequence. Both spectra were recorded under identical conditions, resulting in almost identical intensities of the TMSP diagonal peak. All other resonances, however, increased by a factor of 15–25% when using the flip-back pulse during the mixing time.

An aspect of the sequence of Fig. 1C we have not commented upon yet is its robustness and ease of implementation. Indeed, there are very few experimental parameters to adjust, as we used a low-power rectangular pulse identical to those used in the WATERGATE scheme to flip back the water. Any imperfection of the selective pulse in the mixing time will cause the water magnetization to be in a state $(1 - \epsilon^2)^{1/2}$ of its equilibrium state, where ϵ is the sine of the net flip angle of the combined selective $90^\circ(-x)$ and hard $90^\circ(x)$ pulses. Moreover, as the subsequent water suppression scheme is basically a gradient version of the spin-echo sequence, distortion of the first point is avoided, which eliminates the need of data shifting and/or linear prediction (Davis, 1989). Although the phase of the signals around the water line is not well defined in the ω_2 direction, this is not a problem as the relevant cross peaks are observed in the ω_1 direction. Finally, the modification of the original WATERGATE sequence is almost trivial, and can easily be combined with any sequence where the NOESY is the last step (e.g. HSQC-NOESY) in order to bring the water magnetization close to its equilibrium value at the beginning of the acquisition time, allowing more signal involving rapidly exchanging amide protons to be detected and thus a better definition of the protein structure in regions that would otherwise be considered ill-defined or flexible.

Acknowledgements

We thank Dr. M. Piotto for fruitful discussions. C.D. acknowledges receipt of a graduate fellowship cofinanced by Bruker Spectrospin (France) and the Région-Nord/Pas de Calais (France). The 600 MHz facility used in this study was funded by the Région Nord/Pas de Calais (France), the CNRS and the Institut Pasteur de Lille.

References

- Bloembergen, N. and Pound, R.V. (1954) *Phys. Rev.*, **95**, 8–12.
- Brown, S.C., Weber, P.L. and Mueller, L. (1988) *J. Magn. Reson.*, **77**, 166–169.
- Davis, D. (1989) *J. Magn. Reson.*, **81**, 603–607.
- Grzesiek, S. and Bax, A. (1993a) *J. Am. Chem. Soc.*, **115**, 12593–12594.
- Grzesiek, S. and Bax, A. (1993b) *J. Biomol. NMR*, **3**, 627–638.
- Henry, G.D. and Sykes, B. (1993) *J. Magn. Reson. Ser. B*, **102**, 193–200.
- Hore, P.J. (1989) *Methods Enzymol.*, **176**, 64–77.
- Hoult, D.I. (1976) *J. Magn. Reson.*, **21**, 337–347.
- Jahnke, W. and Kessler, H. (1994) *J. Biomol. NMR*, **4**, 735–740.
- Kalk, A. and Berendsen, H.J. (1976) *J. Magn. Reson.*, **24**, 343–366.
- Kuboniwa, H., Grzesiek, S., Delaglio, F. and Bax, A. (1994) *J. Biomol. NMR*, **4**, 871–878.
- Kumar, A., Ernst, R.R. and Wüthrich, K. (1980) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **95**, 1–6.
- Li, Y.-C. and Montelione, G.T. (1993) *J. Magn. Reson. Ser. B*, **101**, 315–319.
- Liepinsh, E., Otting, G. and Wüthrich, K. (1992) *J. Biomol. NMR*, **2**, 447–465.
- Messerle, B.A., Wider, G., Otting, G., Weber, C. and Wüthrich, K. (1989) *J. Magn. Reson.*, **85**, 608–613.
- Moy, F.J., Scheraga, H., Patt, S.L. and Montelione, G.T. (1992) *J. Magn. Reson.*, **98**, 451–457.
- Otting, G., Liepinsh, E. and Wüthrich, K. (1991) *J. Biomol. NMR*, **1**, 209–215.
- Piotto, M., Saudek, V. and Sklenář, V. (1992) *J. Biomol. NMR*, **2**, 661–665.
- Plateau, P. and Guéron, M. (1982) *J. Am. Chem. Soc.*, **104**, 7310–7311.
- Plateau, P., Dumas, C. and Guéron, M. (1983) *J. Magn. Reson.*, **54**, 46–53.
- Smallcombe, S.H. (1993) *J. Am. Chem. Soc.*, **115**, 4776–4785.
- Sodano, P. and Delepierre, M. (1993) *J. Biomol. NMR*, **3**, 471–477.
- States, D.J., Haberkorn, R.A. and Ruben, D.J. (1982) *J. Magn. Reson.*, **48**, 286–292.
- Stonehouse, J., Shaw, G.L. and Keeler, J. (1994) *J. Biomol. NMR*, **4**, 799–805.
- Van Zijl, P.C.M. and Moonen, C.T.W. (1990) *J. Magn. Reson.*, **87**, 18–25.
- Vlassenbroeck, A. (1993) Ph.D. Thesis, Université Libre de Bruxelles, Belgium.
- Warren, W.S., Hammes, S.L. and Bates, J.L. (1989) *J. Chem. Phys.*, **91**, 5895–5904.
- Zhang, O., Kay, L.E., Olivier, J.P. and Forman-Kay, J.D. (1994) *J. Biomol. NMR*, **4**, 845–858.

3.2 Les trajectoires de l'aimantation de l'eau

Nous avons représenté de façon schématique les trajectoires de l'aimantation macroscopique de l'eau \mathbf{H} (*on resonance*) durant l'expérience *water flip-back* WATERGATE NOESY (Figure II.3).

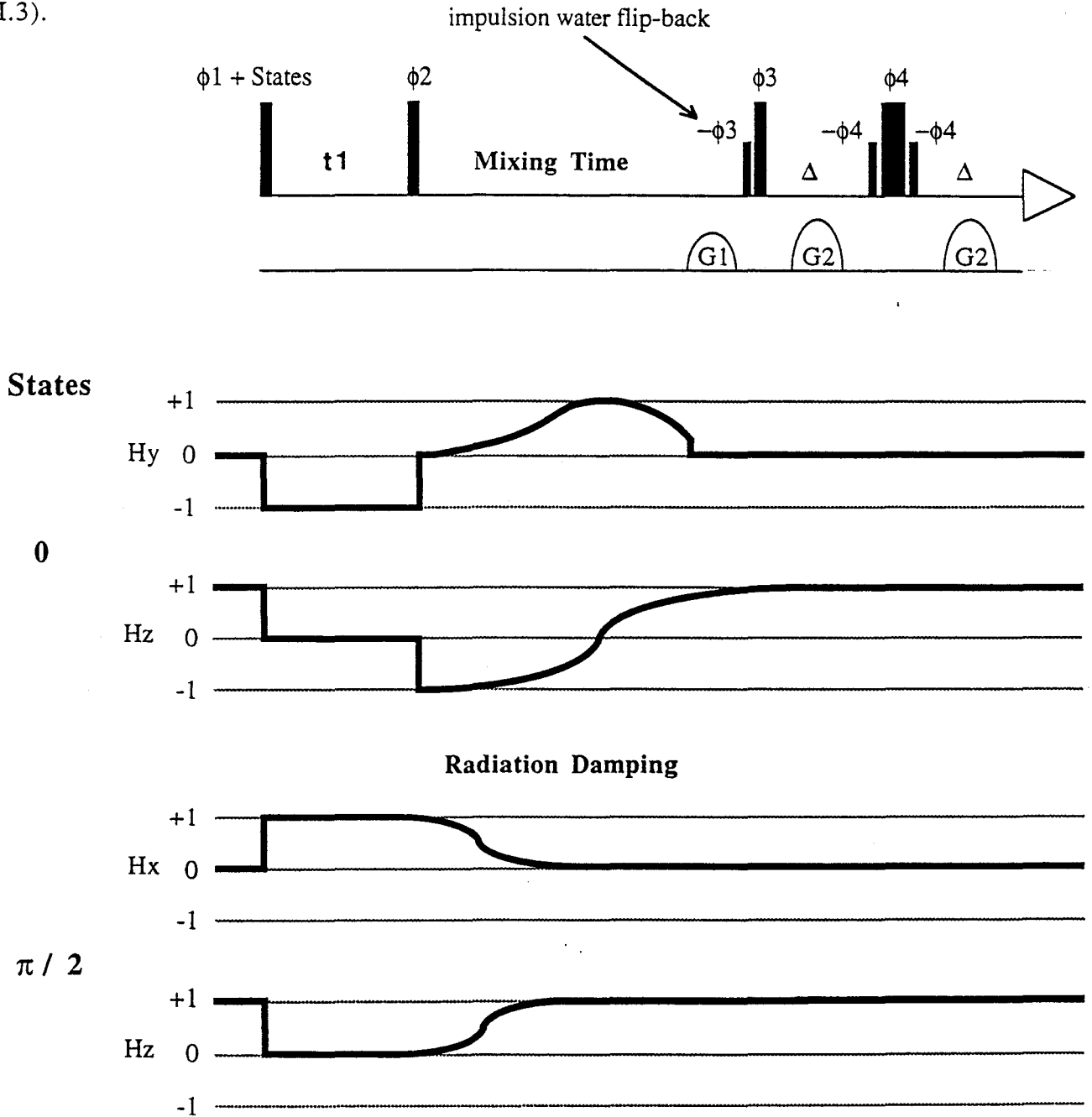


Figure II.3: Les trajectoires sont montrées pour les premières phases ($\phi_1 = x$, $\phi_2 = x$, $\phi_3 = x$, et $\phi_4 = -x$) pour un incrément t_1 de la méthode de States (States *et al.*, 1982). Pour les autres phases, le résultat est similaire aux permutations des termes H_x et H_y près.

La figure II.3 montre que pour les premières phases du cycle d'un incrément t_1 , l'aimantation de l'eau est alignée selon l'axe (-z), ou selon l'axe (+x) au début de la période de mélange τ_m . Dans les deux cas, l'aimantation de l'eau va être amenée par le phénomène de *radiation damping* le long de l'axe (+z) à la fin de la période de mélange, en un temps défini par le temps caractéristique de radiation damping T_{rd} (~ 50 ms à 600 MHz). Il est important de noter que, suite au cyclage de phase complet, le vecteur de l'aimantation de l'eau sera amené à occuper les positions ($\pm x$), ($\pm y$) et ($\pm z$). Néanmoins par le *radiation damping*, le vecteur de l'aimantation de l'eau, indépendamment de l'incrément t_1 et du cyclage de phase, va demeurer invariablement le long de l'axe (+z) à la fin de la période de mélange τ_m . Le *radiation damping* est utilisé de manière positive et constructive dans cette séquence, puisque l'état de l'aimantation de l'eau (le long de l'axe (+z)) est parfaitement reproductible à la fin de la période τ_m . Par l'incorporation d'une impulsion sélective sur l'eau (impulsion *water flip-back*) de phase opposée à la phase de la dernière impulsion de l'expérience NOESY, l'aimantation de l'eau est maintenue le long de l'axe (+z) et ne sera pas affectée par le schéma de suppression d'eau WATERGATE. Ainsi, l'acquisition débute avec une aimantation de l'eau non saturée, et alignée le long de son axe d'équilibre l'axe (+z) (75 % de l'aimantation totale à l'équilibre est obtenue avec un temps de mélange $\tau_m = 150$ ms), de ce fait la suppression du signal de l'eau est très efficace. L'utilisation d'une impulsion *water flip-back* durant l'expérience NOESY permet d'éviter un état saturé de l'aimantation de l'eau et un possible transfert vers les autres protons de la macromolécule via l'échange chimique et la diffusion de spin.

4. La séquence *water flip-back* WATERGATE TOCSY

4.1 Minimisation de l'état de saturation de l'eau dans l'expérience homonucléaire TOCSY

NOTES

An Improved Homonuclear TOCSY Experiment with Minimal Water Saturation

C. DHALLUIN, J.-M. WIERUSZESKI, AND G. LIPPENS*

CNRS URA 1309, Institut Pasteur de Lille, 59000 Lille, France

Received October 18, 1995; revised November 17, 1995

The importance of not saturating the water resonance has long been recognized in liquid-state NMR. Indeed, due to the presence of rapidly exchangeable protons, the process of saturation transfer can lead to a significant loss of sensitivity (1-6). Grzesiek *et al.* recently proposed the use of "water-flip-back" pulses in a ^1H - ^{15}N HSQC sequence in order to restore the water magnetization to its equilibrium position at the start of the acquisition time (7). A number of other heteronuclear correlation spectra have since then been adapted accordingly (8-10).

In many NMR studies of small to medium biomolecules, the homonuclear TOCSY (11, 12) and NOESY (13) experiments are still the basis of resonance assignments and structure determination (14). We recently proposed an improved version of the homonuclear NOESY experiment (15), where radiation damping (16, 17) during the mixing time was used as an active element to restore the water magnetization to its equilibrium state. An NH-selective water-flip-back TOCSY experiment has been proposed, using nonexcitation of the water resonance through an amide proton selective pulse

before the evolution time (18). However, the requirement of pulse shape capabilities as well as of a careful calibration of the shaped pulse for every protein sample could hamper its routine application. In this Note, we report an improved TOCSY experiment based on the sole use of low-power rectangular water-selective pulses, but still resulting in a maximal fraction of the water magnetization along the +z axis at the start of the acquisition time.

In Fig. 1, we present our improved TOCSY sequence which uses a z-filtered scheme (19) incorporating a DIPSI-2 spin lock (20). Ignoring at this moment any further phase cycling and denoting the on-resonance water magnetization by \mathbf{H} , we obtain for the total solute plus solvent magnetization $-\mathbf{I}_z \cos(\omega_1 t_1) - \mathbf{H}_z$ or $+\mathbf{I}_z \sin(\omega_1 t_1) + \mathbf{H}_x$ when incrementing the phase of the first pulse to accomplish sign discrimination in ω_1 (21). The DIPSI-2 sequence transfers magnetization through scalar coupling but its isotropic character assures conservation of the different magnetization vectors. Moreover, when applying the DIPSI super cycle along the y axis, both protein and water magnetization are

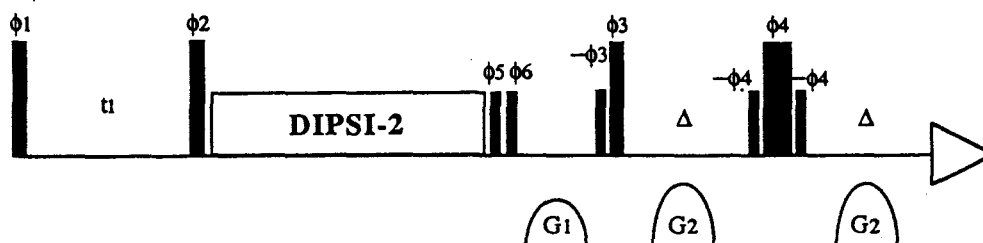


FIG. 1. Improved TOCSY sequence using a z-filtered scheme and incorporating a DIPSI-2 spin-lock. Three "water-flip-back" pulses are included, and the WATERGATE scheme is used for final solvent suppression. Phases used are $\phi 1 = (x, -x, y, -y, -x, x, -y, y)$, $\phi 2 = (x, x, y, y, -x, -x, -y, -y, -x, -x, -y, -y, x, x, y, y)$, $\phi 3 = (x, x, y, y, -x, -x, -y, -y)$, $\phi 4 = (x, x, y, y, -x, -x, -y, -y)$, $\phi 5 = (-x, -x, -y, -y, x, x, y, y, x, x, y, y, -x, -x, -y, -y)$, $\phi 6 = (-x, x, -y, y, x, -x, y, -y)$, and $\text{acq} = (x, -x, y, -y, -x, x, -y, y, -x, x, -y, y, x, -x, y, -y)$. The DIPSI-2 supercycle ($R, -R, -R, R$) is composed as follows: $R = 320^\circ(\phi D) - 410^\circ(-\phi D) - 290^\circ(\phi D) - 285^\circ(-\phi D) - 30^\circ(\phi D) - 245^\circ(-\phi D) - 375^\circ(\phi D) - 265^\circ(\phi D) - 370^\circ(\phi D)$ with $\phi D = (y, -y, -x, x, -y, y, x, -x)$. Frequency discrimination and restoring the water along the +z axis after the mixing period is accomplished by simultaneous incrementation of the phases $\phi 1$ and $\phi 6$.

* To whom correspondence should be addressed.

perpendicular to the rotation axis for both phases. This ensures similar relaxation behavior for the cosine- and sine-modulated terms, avoiding any amplitude offset and a resulting anti-diagonal in the 2D spectrum.

Radiation damping in the presence of the spin-lock pulses tends to retard the rotation when the magnetization vector is going down and enhances the rotation when it is going up (17). However, because the error of flip angle for a π pulse is less than 0.1% with the field strength used in our experiment, it can be neglected. The two soft water-selective terms (Φ_5 and Φ_6) are then applied with phases (+x, +x) for the cosine-modulated term, and with phases (+x, -y) for the sine-modulated term, restoring in an effective manner the water magnetization to the +z axis. For the further phase cycle, the phases Φ_5 and Φ_6 can always be chosen in such a manner as to obtain this goal (see legend to Fig. 1). The two water-selective pulses with their variable phases hence replace the effect of the radiation damping during the NOESY mixing time (15).

The small pulsed field gradient G1 is applied to efficiently remove any unwanted transverse coherences stemming from the nonselected components in ω_1 or from pulse imperfec-

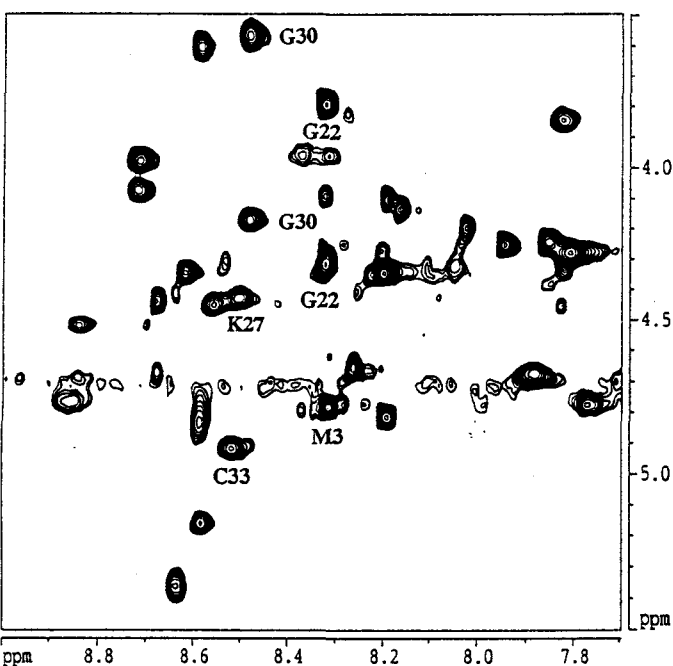


FIG. 2. The NH- α region of 2D phase-sensitive "water-flip-back" TOCSY spectrum of a synthetic analogue of chlorotoxin. A 60 ms DIPSI-2 mixing time was applied with a 13.2 kHz spin-locking field strength. The spectrum was acquired at 309 K on a 1 mM sample of the synthetic mutant (C2A, C19A) of chlorotoxin in H₂O (D₂O 10%) at pH 3.1, on a Bruker 600 MHz DMX spectrometer equipped with a triple-resonance self-shielded z-gradient probehead. Pulsed field gradients are sine-bell shaped with strengths of 8.5 G/cm for G1 and 15 G/cm for those in the WATERGATE scheme. All selective pulses are rectangular with a field strength of 160 Hz. Acquisition obtained with 2K complex points in t_2 , 256 complex t_1 increments with 32 scans per increment and a relaxation delay of 1 s.

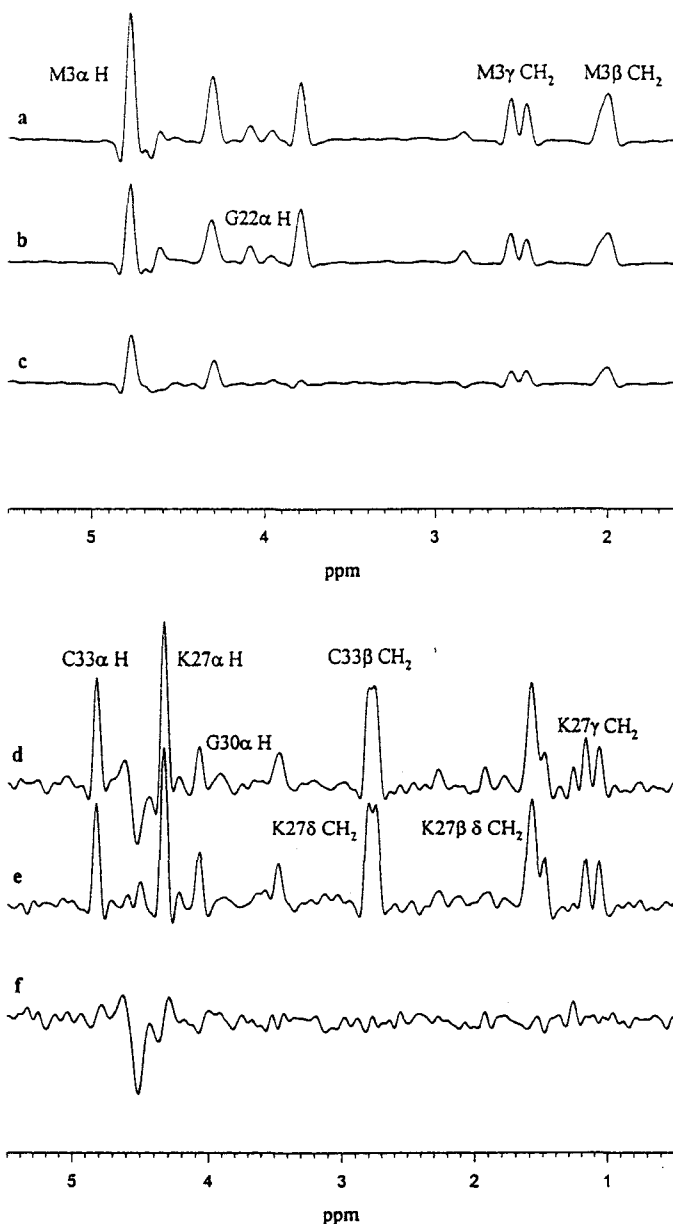


FIG. 3. Slices taken parallel to the ω_1 axis of 2D TOCSY spectra recorded with the pulse sequence of Fig. 1 (b, e), and with the same pulse sequence where the three water-flip-back pulses were omitted (a, d). Difference spectra (c, f) are obtained between slices (a, b) and (d, e) respectively. The cross peaks observed for $\omega_2 = 8.31$ ppm (a, b) arise from residues Met3 and Gly22. The cross peaks for $\omega_2 = 8.50$ ppm (d, e) are assigned to Lys27; in these slices, there also arise cross peaks from residues Gly30 and Cys33 that have amide resonances close to 8.50 ppm.

tions in the DIPSI-2 super cycle. In order to maintain the water magnetization along the +z axis, a final water-flip-back pulse is included with opposite phase to that of the last hard $\pi/2$ pulse, ϕ_3 . The subsequent WATERGATE water suppression scheme (22) does not affect the magnetization component along the z axis, but assures an excellent suppression of any water magnetization that might be present in

the transverse plane. When carefully optimizing the flip-back pulses, we obtained 70% of the full water magnetization at the start of the acquisition data in a 60 ms mixing period 1D TOCSY experiment and with 1 s for relaxation delay.

We tested the improved TOCSY sequence on a synthetic mutant (C2A, C19A) of chlorotoxin, a small 36 a.a. toxin purified from the venom of the *Leirus quinquestriatus* scorpion (23). The 2D performance of our sequence is shown in Fig. 2. The water suppression is excellent, due to the WATERGATE scheme. The gain in intensity for cross peaks involving exchangeable protons is, however, less global compared to that obtained by inclusion of the water-flip-back pulse in the NOESY sequence (15). This is probably due to the fact that spin diffusion in the NOESY experiment leads to a general decrease of magnetization. The improvement of the sequence of Fig. 1 compared to that where all flip-back pulses are omitted is most significant for those residues whose amide protons exchange rapidly with the solvent. The amide protons of Met3 and Gly22 are highly exposed to the solvent in the native chlorotoxin (24). In the TOCSY spectra of the synthetic mutant, the signals in the slices taken parallel to the ω_1 axis at their common resonance frequency (8.31 ppm) are about 15% more intense when using the water-flip-back scheme (Figs. 3a–3c). For residues like Lys27, Gly30, or Cys33 that show a high protection factor from the solvent (24), no significant difference could be observed (Figs. 3d–3f).

In conclusion, we have shown that the simple inclusion of three soft rectangular water-selective pulses with a judicious choice of their phases can lead to an improved TOCSY sequence with minimal water saturation.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Dr. A. Vlassenbroek for fruitful discussions about radiation damping. C.D. acknowledges receipt of a graduate fellowship cofinanced by Bruker Spectrospin (France), and the Région Nord—Pas de Calais (France). The 600 MHz facility used in this study was funded by the Région Nord—Pas de Calais (France), the CNRS, and the Institut Pasteur de Lille.

REFERENCES

1. G. Otting, E. Liepinsh, and K. Wüthrich, *J. Biomol. NMR* **1**, 209 (1991).
2. E. Liepinsh, G. Otting, and K. Wüthrich, *J. Biomol. NMR* **2**, 447, (1992).
3. Y. C. Li and G. T. Montelione, *J. Magn. Reson. B* **101**, 315 (1993).
4. F. J. Moy, H. Scheraga, S. L. Patt, and G. T. Montelione, *J. Magn. Reson.* **98**, 451, (1992).
5. S. H. Smallcombe, *J. Am. Chem. Soc.* **115**, 4776 (1993).
6. G. D. Henry and B. Sykes, *J. Magn. Reson. B* **102**, 193 (1993).
7. S. Grzesiek and A. Bax, *J. Am. Chem. Soc.* **115**, 12593 (1993).
8. J. Stonehouse, G. L. Shaw, J. Keeler, and E. D. Laue, *J. Magn. Reson. A* **107**, 178 (1994).
9. L. E. Kay, G. Y. Xu, and T. Yamazaki, *J. Magn. Reson. A* **109**, 129 (1994).
10. J. Stonehouse, R. T. Clowes, G. L. Shaw, J. Keeler, and E. D. Laue, *J. Biomol. NMR* **5**, 226 (1995).
11. A. Bax and D. G. Davis, *J. Magn. Reson.* **65**, 355 (1985).
12. L. Braunschweiler and R. R. Ernst, *J. Magn. Reson.* **53**, 521 (1991).
13. A. Kumar, R. R. Ernst, and K. Wüthrich, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **95**, 1 (1980).
14. K. Wüthrich, "NMR of Proteins and Nucleic Acids," Wiley, New York 1986.
15. G. Lippens, C. Dhalluin, and J. M. Wieruszkeski, *J. Biomol. NMR* **5**, 327 (1995).
16. N. Bloembergen and R. V. Pound, *Phys. Rev.* **95**, 8 (1954).
17. W. S. Warren, S. L. Hammes, and J. L. Bates, *J. Chem. Phys.* **91**, 5895 (1989).
18. J. Schleucher, J. L. Markley, and C. Griesinger, ENC Experimental NMR Conference, Poster P9, Boston, 1995.
19. M. Rance, *J. Magn. Reson.* **63**, 557 (1987).
20. A. J. Shaka, C. J. Lee, and A. Pines, *J. Magn. Reson.* **77**, 274 (1988).
21. D. J. States, R. A. Haberkorn, D. J. Ruben, *J. Magn. Reson.* **48**, 286 (1982).
22. M. Piotto, V. Saudek, and V. Sklenar, *J. Biomol. NMR* **2**, 661 (1992).
23. J. A. Debin, J. E. Maggio, and G. R. Strichartz, *Am. J. Physiol. Soc. C* **369**, 264 (1993).
24. G. Lippens, J. Najib, S. J. Wodak, and A. Tartar, *Biochemistry* **34**, 13 (1995).

4.2 Les trajectoires de l'aimantation de l'eau

Nous avons représenté de façon schématique la trajectoire de l'aimantation macroscopique de l'eau \mathbf{H} (*on resonance*) durant l'expérience *water flip-back* WATERGATE TOCSY (Figure II.4).

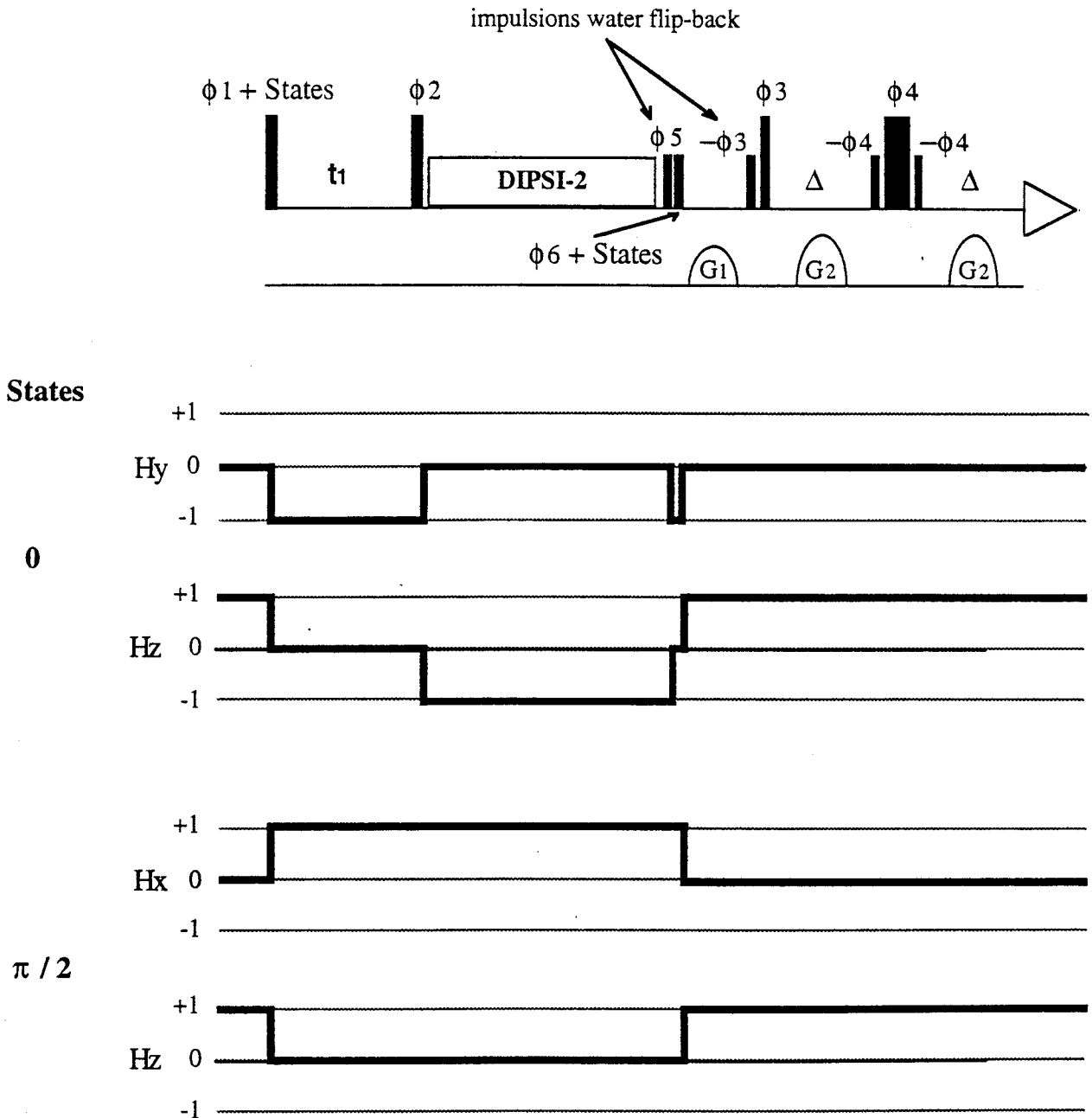


Figure II.4: Les trajectoires sont montrées pour les premières phases ($\phi_1 = x$, $\phi_2 = x$, $\phi_3 = x$, et $\phi_4 = x$, $\phi_5 = x$, et $\phi_6 = -x$) pour un incrément t_1 de la méthode de States (States *et al.*, 1982).

Pour les autres phases, le résultat est similaire aux permutations des termes H_x et H_y près. Pour obtenir les effets désirés sur l'aimantation de l'eau, les phases ϕ_1 et ϕ_6 sont incrémentées simultanément suivant la méthode de States.

Pour minimiser la saturation de l'eau dans l'expérience TOCSY, nous avons privilégié l'utilisation d'une séquence *z-filter* (Rance, 1987) par rapport à la séquence classique clean-TOCSY (Griesinger *et al.*, 1988). Dans cette dernière expérience, des impulsions *trim pulse* sont appliquées avant et après la séquence MLEV-17 pour éliminer toutes les aimantations qui ne seraient pas non alignées le long de la direction de départ. L'aimantation de l'eau, lorsqu'elle n'est pas alignée selon la direction de la première impulsion *trim pulse*, est défocalisée en raison des inhomogénéités de champ radiofréquence juste avant l'entrée dans la séquence *spin-lock*, il est alors impossible d'obtenir un état comparable de l'eau pour toutes les phases et tous les incréments t_1 . L'avantage de la séquence *z-filter* est qu'elle va nous permettre de conserver l'état de l'aimantation de l'eau après le *spin-lock*, et nous faciliter sa manipulation durant l'expérience.

La figure II.4 montre que pour les premières phases du cycle d'un incrément t_1 , l'aimantation de l'eau est alignée selon l'axe (-z), ou selon l'axe (+x) au début de la période de mélange. Dans la séquence, le caractère isotrope du transfert de l'aimantation durant le *spin-lock* DIPSI-2 (Shaka *et al.*, 1988) assure la conservation de la direction des différents vecteurs d'aimantation entre le début et la fin de la période de mélange. Cependant nous ne pouvons plus bénéficier de la contribution positive du *radiation damping*, qui ramène l'aimantation de l'eau selon l'axe (+z), car les effets du *radiation damping* sont éliminés par l'application du *spin-lock* DIPSI-2 nécessaire pour le transfert des aimantations de la macromolécule via les constantes de couplage (Warren *et al.*, 1989). Ainsi, à la fin de la séquence DIPSI-2 l'aimantation de l'eau est alignée selon l'axe (-z) ou selon l'axe (+x) comme au début de la période de mélange. L'incorporation de deux impulsions sélectives *water flip-back* ϕ_5 et ϕ_6 , a été nécessaire pour remplacer l'effet du *radiation damping*: ces deux impulsions vont tourner l'aimantation de l'eau le long de l'axe (+z) (Figure II.4). Lorsque l'aimantation de l'eau est $-H_z$ les phases sont $\phi_5 = -x$

et $\phi_6 = -x$, lorsque l'aimantation de l'eau est H_x la phase ϕ_6 est incrémentée telle $\phi_5 = -x$ et $\phi_6 = -y$.

Après un cyclage de phase complet, le vecteur de l'aimantation de l'eau sera amené à occuper les positions $(\pm x)$, $(\pm y)$ et $(\pm z)$. Les phases ϕ_5 et ϕ_6 sont calculées exactement en fonction de la direction du vecteur aimantation de l'eau à la fin de la période de mélange, et pour chaque incrément t_i : elles auront un effet de rotation de 0° , 90° ou 180° sur l'aimantation de l'eau de façon à la placer pour toutes les phases et pour tous les incréments t_i le long de l'axe $(+z)$. Ensuite, par l'incorporation d'une dernière impulsion sélective *water flip-back* de phase opposée à ϕ_3 (Figure II.4), l'aimantation de l'eau est maintenue le long de l'axe $(+z)$ et ne sera pas affectée par le schéma WATERGATE. L'acquisition débute ainsi avec une aimantation de l'eau dans un état non saturé et alignée le long de son axe d'équilibre l'axe $(+z)$ (70 % de l'aimantation totale à l'équilibre sont obtenus avec un temps de mélange de 60 ms), de ce fait la suppression du signal de l'eau est très efficace.

C. Conclusion

Nous avons montré que par l'incorporation d'impulsions sélectives sur l'eau *water flip-back* dans les séquences homonucléaires NOESY et TOCSY, nous sommes capables de travailler non plus contre l'eau mais avec l'eau. Dans ces deux séquences qui constituent les expériences de base de la RMN biologique, un état non saturé de l'aimantation de l'eau est obtenu au début de la période d'acquisition, minimisant ainsi la perte d'intensité et de résolution des pics de croisement, liée aux phénomènes d'échange rapide des protons labiles avec les protons de l'eau et au phénomène de diffusion de spin.

D. Références

- Anklin, C.; Rindlisbacher, M.; Otting, G; Laukien, F. H. *J. Magn. Reson. Series B* **1995**, *106*, 199-201.
- Bloembergen, N.; Pound, R. V. *Phys. Rev.* **1954**, *95*, 8-12.
- Braunschweiler, L.; Ernst, R. R. *J. Magn. Reson.* **1983**, *53*, 521-528.
- Broekaert, P.; Jeener, J. *J. Magn. Reson. Series A* **1995**, *113*, 60-64.
- Hoult, D. J. *J. Magn. Res.* **1976**, *21*, 337-347.
- Guéron, M. *Magn. Res. Med.* **1991**, *19*, 31-41.
- Guéron, M.; Plateau, P.; Decorps, M. *Prog. NMR Spectrosc.* **1991**, *23*, 135-209.
- Griesinger, C.; Otting, G.; Wüthrich, K.; Ernst, R. R. *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110*, 7870-7872.
- Grzesiek, S.; Bax, A. *J. Am. Chem. Soc.* **1993a**, *115*, 12593-12594.
- Grzesiek, S.; Bax, A. *J. Biol. NMR* **1993b**, *3*, 627-638.
- Jahnke, W.; Kessler, H. *J. Biol. NMR* **1994**, *4*, 735-740.
- Jeener, J.; Meier, B. H.; Bachmann, P.; Ernst, R. R. *J. Chem. Phys.* **1979**, *71*, 4546-4553.
- Kuboniwa, H.; Grzesiek, S.; Delaglio, F.; Bax, A. *J. Biol. NMR* **1994**, *4*, 871-878.
- Kumar, A.; Ernst, R. R.; Wüthrich, K. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1980**, *95*, 1-6.
- Louis-Joseph, A.; Abergel, D.; Lallemand, J.-Y. *J. Biol. NMR*, **1995**, *5*, 212-216.
- Otting, G. *J. Magn. Res. Series B* **1991**, *103*, 288-291.
- Otting, G.; Liepinsh, E.; Wüthrich, K. *J. Biol. NMR*, **1991**, *1*, 209-215.
- Otting, G.; Wüthrich, K. *J. Magn. Res.* **1988**, *76*, 569-574.

- Piotto, M.; Saudek, V.; Sklenar, V. *J. Biol. NMR*, **1992**, *2*, 661-665.
- Plateau, P.; Guéron, M. *J. Am. Chem. Soc.* **1982**, *104*, 7310-7311.
- Rance, M. *J. Magn. Reson.* **1987**, *63*, 557-564.
- Redfield, A. G.; Kunz, S. D.; Ralph, E. K. *J. Magn. Res.* **1975**, *19*, 114-117.
- Shaka, A. J.; Lee, C. J.; Pines, A. *J. Magn. Res.* **1988**, *77*, 274-293.
- Sodano, P.; Delepierre, M. *J. Biol. NMR* **1993**, *3*, 471-477.
- Sklenar, V. *J. Magn. Reson. Series A* **1995**, *114*, 132-135.
- Smallcombe, S. *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 4776-4785.
- Smallcombe, S.; Patt, S. L.; Keifer, P. A. *J. Magn. Reson. Series A* **1995**, *117*, 295-303.
- States, D. J.; Haberkorn, R. A.; Ruben, D. J. *J. Magn. Res.* **1982**, *48*, 286-292.
- Stonehouse, J.; Shaw, G. L.; Keeler, J. *J. Biol. NMR* **1994**, *4*, 799-805.
- VanZijl, P.; Moonen, C. T. W. *J. Magn. Res.* **1990**, *87*, 18-25.
- Vlassenbroek, A. Thèse de doctorat, Université libre de Bruxelles, Belgique, **1993**.
- Warren, W. S.; Hammes, S. L.; Bates, J. L. *J. Chem. Phys* **1989**, *91*, 5895-5904.
- Wüthrich, K. *NMR of Proteins and Nucleic Acids*, John Wiley and Sons, New York, **1986**.

CHAPITRE III

La détermination de la structure tridimensionnelle d'une toxine d'araignée

A. Introduction

Les neurotoxines animales font l'objet depuis le début du siècle d'un intérêt croissant parmi les scientifiques. En effet, quelles que soit leurs origines, elles constituent des outils formidables pour l'étude et la compréhension du système physiologique. D'autre part, elles commencent à prendre une place très importante dans la recherche de nouveaux modèles en chimie thérapeutique et dans la recherche de nouveaux agents insecticides.

Les canaux ioniques sont l'une des principales cibles des neurotoxines de venin d'animaux. Chaque toxine agit de façon spécifique sur un canal ionique donné (sodique, potassique, chlorure ou calcique). Ces toxines sont de nature polypeptidiques, et assurent une grande partie du potentiel toxique du venin. Elles sont de petite taille, entre 10 et 70 acides aminés et possèdent de nombreux ponts disulfures, ce qui leur confère une grande stabilité. Ces neurotoxines animales sont largement utilisées pour la caractérisation et la classification des différents types et sous types de canaux ioniques.

Les canaux sodiques sont essentiellement affectés par les neurotoxines de scorpion à chaîne longue (70 acides aminés) (Kopeyan *et al.*, 1985) et par les μ -Agatoxines isolées du venin d'araignée *Agelenopsis Aperta* (Omecinsky *et al.*, 1996). Les canaux potassiques ont pour principaux ligands les toxines de scorpion à chaîne courte (30 à 40 acides aminés) telles que la Scyllatoxine (Auguste *et al.*, 1992) et la Charybdotoxine (Bontems *et al.*, 1991). Pour les canaux chlorures un seul ligand spécifique a été identifié jusqu'à présent: la Chlorotoxine isolée du venin de scorpion *Leirus Quinquetriatus* (Debin *et al.*, 1993). Les canaux calciques sont affectés spécifiquement par les ω -Conotoxines isolées du venin de serpent de mer *Conus Geographus* (Gray *et al.*, 1988), et par les ω -Agatoxines isolées du venin d'araignée *Agelenopsis Aperta* (Oliviera *et al.*, 1984). La diversité de ces toxines est liée à l'hétérogénéité des canaux ioniques. Chaque famille de canal est divisée en sous-types de canaux ioniques différant quant à leur fonction et à leur

localisation tissulaire. Ainsi ces toxines permettent grâce à leur spécificité de caractériser et classifier les sous-types de canaux ioniques.

Nous allons nous intéresser dans ce chapitre au canaux calciques. Le calcium est impliqué dans de nombreux mécanismes cellulaires tels que la production de la réponse cellulaire et physiologique, l'activation enzymatique, la libération de neurotransmetteurs, la régulation de l'activité des canaux ioniques, l'expression des gènes et la mort de la cellule. La principale voie d'entrée du calcium dans les cellules excitables telles que les cellules musculaires et les cellules sécrétrices sont les canaux calciques voltage-dépendants. Ces canaux sont parmi les plus hétérogènes des canaux ioniques et sont divisés en deux groupes principaux selon leurs propriétés électrophysiologiques: les canaux de type T activés à bas voltage et de type L activés à haut voltage. Aucun ligand peptidique n'est connu pour l'instant pour ces sous-types de canaux. D'autres sous types de canaux calciques, de propriétés électrophysiologiques intermédiaires entre les canaux T et L, ont été identifiés comme étant inhibés spécifiquement par des ligands peptidiques: les canaux calciques de type P et N. Une dernière classe de canaux de type Q et R a été identifiée, mais pour ces derniers aucun ligand spécifique n'est pour l'instant connu. Tous ces canaux existent à la surface des cellules.

Les venins de serpent de mer et les venins d'araignées représentent une source naturelle de toxines affectant les canaux calciques. Dans les venins de serpent de mer, nous trouvons les ω -Conotoxines isolées du venin de *Conus Geographus* qui sont classées parmi les plus petites toxines animales de nature peptidique (Gray *et al.*, 1988). Leur taille varie de 10 à 30 acides aminés. Les araignées quant à elles restent l'espèce la moins explorée à l'heure actuelle. C'est la difficulté inhérente à la collecte de ces venins qui semble avoir freiné l'étude de ces toxines. Le venin de l'espèce *Agelenopsis Aperta* est l'un des venins le plus étudié jusqu'à présent. Quatre type de toxines ont été isolés de ce venin, les ω -Agatoxines I, II, III, et IV. Néanmoins récemment deux autres familles de toxines, spécifiques aux canaux calciques, ont été isolées à partir du venin d'araignées différentes: la toxine SNX325 isolée du venin de *Segestria Florentina* (Newcomb *et al.*, 1995), et la ω -Atracotoxine HV1 isolée du venin de *Hadronyche Versuta* (Fletcher *et al.*, 1997).

V50F17	GKCL_NKGEVCKGKMSD_P__CCSGN__CHCSAP_LSPIAMIQLMAGY_CNCR
V50F18	GKCL_NKGEVCKGKMSN_P__CCSGN__CHCSAP_ISPIAIIQLMAGY_CNCQ
V50F20	GDCIPK_GESC_GLVWWGP__CCTGHRRCDCPDPQISFVQLYNAIAG_NCKCI
V50F21	EDKCL_KNGEVCKGKFSE_P__CCSGQY_CHCDSP_LSIIAIFQLALGY_CKCHTS
V50F22	EDKCL_KNGEVCKGKFSE_P__CCSGQY_CHCDSP_LSIIAIFQLAFGY_CKCHTS
SNX325	GSCIES_GKSCTHSRSMKNGLCPPKSR_CNCRQIQHRHDYLG_KRK_YS

V50F17	GKCL_NKGEVCKGKMSD_P__CCSGN__CHCSAP_LSPIAMIQLMAGY_CNCR
ω -Aga IVA	KKKCI AKDYGRCK_WGGT_P__CC_RGRGCTC-----SIMGTNCECKPRLIMEGLGLA
ω -Aga IVB	EDNCIAEDYCKCT_WGGT_K__CC_RGRPCRC-----SMIGTNCECTPRLIMEGLSFA
Versuta	SPTCIPSGQPC-----PYNENCCSQ__SCITFRKENENGNITVKKR-----CD
ω -Con GVIA	CKSXGSSSCSXTSYN__CCRSCTNXYTKR-----CY

X=hydroxyproline

Table III.1: (Haut) Séquence primaire des toxines fractionnées du venin V50 de l'araignée *Segestria Florentina* (LATOXAN, Rosans, France). Les toxines F12, F17, F18, F20, F21 et F22 sont comparées à la toxine SNX235 isolée du venin de la même araignée (Newcomb *et al.*, 1995). (Bas) La séquence primaire de la toxine V50F17 est comparée aux séquences des toxines ω -Agatoxine IVA et B (48 résidus) isolées du venin de l'araignée *Agelenopsis Aperta* (Oliviera *et al.*, 1984), à la séquence de la ω -Atracotoxine HV1 (37 résidus) isolée du venin de l'araignée *Hadronyche Versuta* (Fletcher *et al.*, 1997), et avec la séquence de la ω -Conotoxine GIVA (28 résidus) isolée du venin de serpent de mer *Conus Geographus* (Gray *et al.*, 1988). Les parties ombrées sur les séquences correspondent aux domaines appartenant au feuillet des trois brins β antiparallèles (Kim *et al.*, 1995; Reily *et al.*, 1995; Fletcher *et al.*, 1997; Davis *et al.*, 1993). Pour la toxine V50F17 (45 résidus), quatre brins β ont été identifiés, le premier brin ne participant pas au feuillet β antiparallèle. Un domaine en hélice α (Ile32-Gln36) a également été identifié, il est repéré par des pointillés.

Pour la ω -Conotoxine GVIA de serpent de mer, et les ω -Agatoxines IV A et B et la ω -Atracotoxine HV1 d'araignée les structures tridimensionnelles en solution sont connues et ont été déterminées par RMN (voir table III.1) (Davis *et al.*, 1993; Kim *et al.*, 1995; Reily *et al.*, 1995; Fletcher *et al.*, 1997).

Dans ce chapitre nous allons présenter la structure tridimensionnelle en solution d'une nouvelle toxine isolée du venin de l'araignée *Segestria Florentina*. Ce venin a été fourni par la société LATOXAN (Rosans, France). Ce venin nommé V50 a été fractionné au laboratoire. La fraction portant le numéro 17 a été retenue pour l'étude. Des tests d'activité de la toxine, que nous nommerons V50F17, ont montré qu'elle agissait spécifiquement sur les canaux calciques de type N. Après la détermination de la séquence primaire par analyse des acides aminés et spectrométrie de masse (travail réalisé par Nathalie Mokrzycki au laboratoire), les résultats ont montré que la toxine V50F17 est constituée de 45 acides aminés, dont 8 cystéines engagées en pont disulfure (voir table III.1). Une synthèse peptidique directe a permis d'obtenir une quantité suffisante de la toxine pour une étude détaillée de la structure tridimensionnelle.

B. Matériels et méthodes

1. Préparation de l'échantillon pour l'analyse RMN

L'échantillon a été préparé en dissolvant 6 mg de la toxine synthétique V50F17 dans 500 μ l d'un mélange H_2O/D_2O (90%/10%) ou uniquement dans D_2O pour les expériences d'échange, soit une concentration de 2.5 mM pour les expériences RMN homonucléaires. Pour les expériences hétéronucléaires, la protéine a été lyophilisée et dissoute dans 270 μ l de D_2O , puis placée dans un tube Shigemi (Shigemi Inc., Allison Park, PA, USA), soit une concentration de 4.7 mM. Après dissolution de la toxine, le pH était de 2.9: aucun réajustement du pH n'a été réalisé. Le tétraméthylsilyl-propionate a été utilisé comme composé de référence pour les déplacements chimiques 1H et ^{13}C .

2. Acquisition des données RMN

Tous les spectres RMN ont été obtenus sur un spectromètre Bruker DMX-600 à deux températures 4°C et 30°C. Les données RMN ont été traitées à l'aide du logiciel XWINNMR sur une station Silicon Graphics R4000.

Les expériences homonucléaires ^1H TOCSY (Braunschweiler & Ernst, 1983; Davis & Bax, 1985) et NOESY (Jeener *et al.*, 1979; Kumar *et al.*, 1980) ont été obtenues en utilisant une matrice de 4096*1024 points complexes dans les dimensions ω_1 et ω_2 respectivement, sur une fenêtre spectrale totale de 12 ppm dans les deux dimensions. L'expérience DQF-COSY (Müller *et al.*, 1986) a été réalisée en utilisant une matrice 8192*1024 points complexes afin d'augmenter la résolution spectrale pour la mesure des constantes de couplage $^3J_{\text{NH-H}\alpha}$. La méthode States-TPPI a été utilisée pour la discrimination du signe des fréquences en dimension ω_1 (Marion & Wüthrich, 1983). La suppression du signal du solvant a été réalisée en utilisant le schéma WATERGATE (Piotto *et al.*, 1992) dans les expériences TOCSY et NOESY, et en présaturant le signal de l'eau durant le délai de relaxation dans l'expérience DQF-COSY. La minimisation de l'état de saturation du signal de l'eau a été obtenue dans les expériences WATERGATE TOCSY et WATERGATE NOESY en incorporant des impulsions sélectives sur l'eau (impulsions *water flip-back*). Dans l'expérience *water flip-back* WATERGATE TOCSY (Dhalluin *et al.*, 1996), un champ *spin-lock* DIPSI-2 de force 10 kHz a été utilisé durant une période de mélange de 80 ms. Les temps de mélange des expériences *water flip-back* WATERGATE NOESY (Lippens *et al.*, 1995), étaient de 50 ms et 200 ms.

Les expériences d'échange des protons labiles de la protéine avec le deutérium ont été réalisées en dissolvant la protéine dans D_2O et en collectant à 4°C alternativement une série de spectres 1D et une série de courtes expériences 2D TOCSY (80 ms) de durée 50 minutes chacune.

Les expériences hétéronucléaires ^1H - ^{13}C HSQC, HSQC-TOCSY (100 ms) et HSQC-NOESY (200 ms) (Wider & Wüthrich, 1993) ont été obtenues en utilisant une matrice 4096*1024 points complexes avec une fenêtre spectrale de 12 ppm en ^1H et de 80 ppm en ^{13}C . Ces spectres ont été enregistrés à 30°C en abondance naturelle sur un échantillon dissout dans D_2O .

3. Génération des structures

3.1 Contraintes sur les distances

Les contraintes sur les distances ont été réparties en trois classes ($2.0 \text{ \AA} < d < 2.8 \text{ \AA}$), ($2.0 \text{ \AA} < d < 3.5 \text{ \AA}$) et ($2.0 \text{ \AA} < d < 5.5 \text{ \AA}$) correspondant respectivement aux intensités fortes, médium et faibles des contacts NOE. Les résultats des expériences d'échange dans D_2O nous ont permis d'introduire des liaisons hydrogènes sous forme de contraintes de distance entre le proton amide NH et l'oxygène du CO accepteur.

3.2 Contraintes sur les angles dièdres

Les contraintes sur les angles dièdres ϕ ont été estimées à partir de la mesure des constantes de couplage $^3J_{\text{NH-H}\alpha}$ sur le spectre DQF-COSY (Karplus, 1959; Pardi *et al.*, 1984). Deux classes de contraintes sur les angles ϕ ont été considérées: $-120^\circ(\pm 40^\circ)$ et $-60^\circ(\pm 40^\circ)$ pour les constantes de couplage ($^3J > 8 \text{ Hz}$) et ($^3J < 6 \text{ Hz}$) respectivement. Les contraintes sur les angles dièdres χ_1 ont été divisées en trois classes, $\{60^\circ(\pm 60^\circ), 180^\circ(\pm 60^\circ), -60^\circ(\pm 60^\circ)\}$, à partir de l'attribution stéréospécifique des protons H β (Wagner *et al.*, 1987).

3.3 Calcul de structures

Les structures ont été calculées à partir du programme X-PLOR (Brünger, 1992). Ce programme permet le calcul de structures moléculaires à partir d'une estimation des distances interprotons issues des expériences RMN NOESY, des mesures de constante de couplage et de d'autres informations telles que les ponts disulfures et les liaisons hydrogènes (voir Annexe III.1).

Dans une première étape, une structure de conformation étendue arbitraire est calculée avec toutes les informations moléculaires issues de la structure primaire de la protéine (nature des acides aminés, longueurs des liaisons atomiques, angles de valence). Aucune contrainte de distance, d'angle dièdre, de liaison hydrogène ou de pont disulfure n'est utilisée pour ce calcul. La structure étendue ainsi obtenue est ensuite soumise à une procédure de *Distance Geometry*, où toutes les contraintes sur les distances et sur les angles sont utilisées. Les contraintes sont traduites en termes énergétiques en utilisant une expression harmonique des énergies avec les constantes de force $k_b = 50 \text{ kcal mol}^{-1} \text{ \AA}^{-2}$ et $k_\phi = 200 \text{ kcal mol}^{-1} \text{ rad}^{-2}$ pour les contraintes NOE et diédrales respectivement. Dans cette procédure, les ponts disulfures ne sont pas introduits en terme de liaison covalente mais en tant que contrainte de distance très sévère entre les atomes de soufre des cystéines impliqués dans un pont disulfure. Chacune des structures ainsi obtenues sera soumise à une procédure de recuit simulé consistant en 1000 étapes de dynamique moléculaire à 2000 K, suivi d'un refroidissement en 1000 étapes jusqu'à température ambiante. Finalement ces structures seront affinées par une seconde procédure de recuit simulé, avec une température initiale de 1000 K suivi d'un refroidissement en 1000 étapes. Parmi ces structures, ne seront conservées et analysées que celles présentant des violations de NOE inférieures à 0.3 Å.

L'analyse des structures est ensuite réalisée à l'aide du logiciel PROCHECK (Laskowski *et al.*, 1993). Toutes ces structures seront visualisées et comparées dans le module INSIGHTII du logiciel BIOSYM.

4. Détermination des ponts disulfures

Les ponts disulfures de l'état natif de la toxine d'araignée V50F17 ont été déterminés à partir d'une analyse statistique des distances C β -C β entre toutes les cystéines de la protéine dans une famille de structures non affinées (Klaus *et al.*, 1993).

Considérations statistiques

Dans une protéine contenant n résidus cystéine, qui sont tous engagés en pont disulfure, il existe potentiellement $n(n-1)/2$ ponts disulfures possibles. Ces ponts disulfures peuvent, par permutation, générer $n!/(2^{n/2} * (n/2)!)$ combinaisons différentes de ponts disulfures. Dans l'état natif de la protéine, une seule de ces combinaisons est réalisée. Dans le cas de la toxine d'araignée V50F17 qui contient 8 résidus cystéine il existe potentiellement 28 ponts disulfures possibles (voir Annexe III.2), et 105 combinaisons possibles de ponts disulfures (voir Annexe III.3).

Pour analyser toutes ces combinaisons, le calcul statistique procède en deux étapes. Dans la première étape, nous calculons pour une famille de N structures non affinées et pour chacun des 28 ponts disulfures potentiels un poids statistique W_{ij} , où i et j sont les cystéines reliées en pont disulfure:

$$W_{ij} = \frac{1}{N} \sum_{n=1}^N \exp - \left\{ 0.5 * \frac{(r_{ij}^n - r_0)^2}{s^2} \right\}$$

Les poids statistiques W_{ij} des 28 ponts disulfures possibles sont calculés à partir des distances r_{ij} entre les carbones C β de toutes les cystéines dans chacune des N structures. Lorsque la distance r_{ij} entre deux carbones C β dans les N structures approche la distance moyenne $r_0 = 3.84 (\pm 0.24)$ Å, la fonction de distribution assure que le poids statistique W_{ij} correspondant est 1.0. Le poids W_{ij} peut être considéré comme la probabilité qu'une paire donnée de cystéines est engagée en

pont disulfure. Le paramètre s définit la largeur de la fonction de distribution pour tenir compte de la dispersion des distances r_{ij} par rapport à r_0 dans les N structures. Augmenter la valeur de s conduit à augmenter le poids statistique W_{ij} des paires potentielles de poids statistique faible.

Dans la seconde étape, nous calculons le poids statistique des $p = 105$ combinaisons possibles de ponts disulfures à partir du poids statistique des paires individuelles participant à chaque combinaison.

$$W_p = \prod W_{ij}$$

La combinaison p présentant le poids statistique le plus élevé permet d'identifier la combinaison des ponts disulfures dans l'état natif de la protéine.

Calcul des W_{ij} et W_p pour la toxine d'araignée V50F17

Le calcul statistique a consisté à calculer les distances $C\beta$ entre les 28 ponts disulfures potentiels de la protéine à partir de 100 structures non affinées obtenues après les procédures de *Distance Geometry* et de recuit simulé dans le programme X-PLOR. Pour la génération des 100 structures, toutes les contraintes sur les distances et sur les angles dièdres (ϕ, χ_1) ont été prises en compte, hormis les contraintes NOE entre cystéines et les contraintes de liaisons hydrogènes. De même les liens covalents entre cystéines ont été exclus des fichiers de topologie pour le calcul des 100 structures (Klaus *et al.*, 1993). Le calcul des poids statistiques W_{ij} et W_p a été réalisé à l'aide d'un programme que nous avons écrit en C-Shell sur une station UNIX.

C. Résultats

1. L'attribution

1.1 L'attribution séquentielle

L'attribution séquentielle en ^1H a été réalisée à 30°C et à $\text{pH} = 2.9$ sur un échantillon de 2.5 mM de la toxine d'araignée V50F17 dans un mélange $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ (90%/10%) selon la procédure développée par Wüthrich (Wüthrich, 1986). La bonne dispersion des résonances a permis une attribution directe des systèmes de spins. Tous les résidus ont pu être identifiés sur la base de leur déplacement chimique et à partir des connexions observées après transfert via les constantes de couplage dans l'expérience TOCSY. L'attribution séquentielle a été obtenue à partir des contacts NOE $\alpha\text{N}(i, i+1)$ et $\beta\text{N}(i, i+1)$. La figure III.1 montre l'attribution séquentielle dans le domaine NH-H α du spectre NOESY. L'attribution des ^1H des chaînes latérales a été réalisée dans le domaine aliphatique des spectres TOCSY et NOESY dans D_2O . Pour les trois résidus proline de la séquence, des contacts NOE caractéristiques X-Pro $\alpha\delta(i, i+1)$ ont montré que ces résidus adoptaient une conformation de type *trans* (Wüthrich, 1986). L'attribution stéréospécifique a été obtenue pour 11 paires de protons méthylène H β en se basant sur l'analyse de l'intensité des contacts NOE intrarésidu du type (H α /H β) et (NH/H β), et en évaluant la constante de couplage $^3J_{\text{H}\alpha\text{-H}\beta}$ (Wagner *et al.*, 1987). L'attribution en ^1H a également été réalisée à 4°C de manière à déplacer le signal de l'eau et à résoudre les ambiguïtés dues à des superpositions de pics.

1.2 L'attribution des carbones

L'attribution a été complétée par l'identification des résonances des carbones à partir des spectres ^1H - ^{13}C HSQC et ^1H - ^{13}C HSQC TOCSY obtenus à 30°C sur un échantillon de 4.7 mM

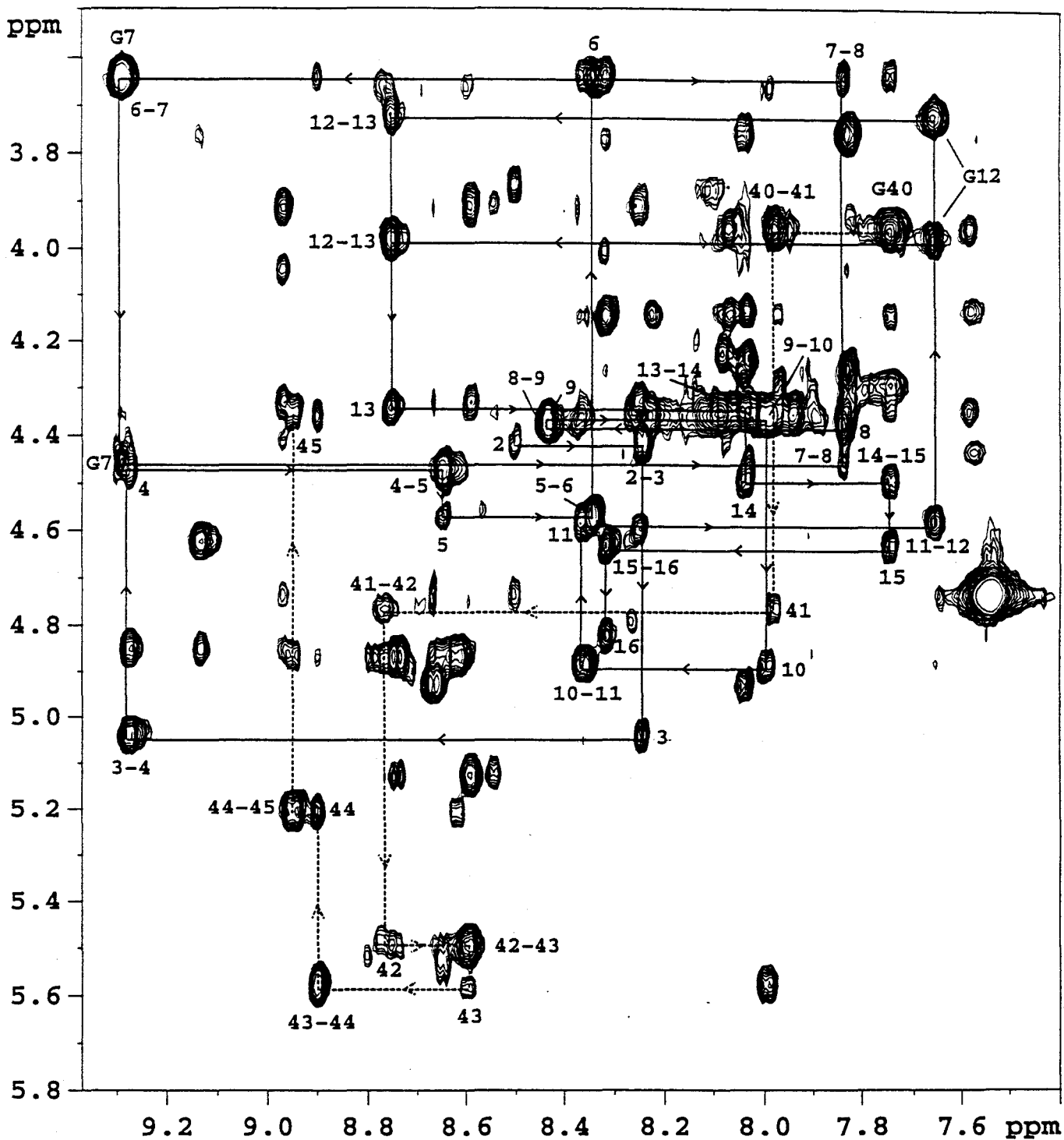


Figure III.1: Spectre NOESY (200ms) de la toxine d'araignée V50F17 dans un mélange H₂O/D₂O (90%/10 %), à pH = 2.9 et à 30°C montrant l'attribution séquentielle $\alpha N(i, i+1)$ depuis le résidu Lys2 jusqu'au résidu Asp16 d'une part, et depuis le résidu Gly40 jusqu'au résidu Arg45 d'autre part.

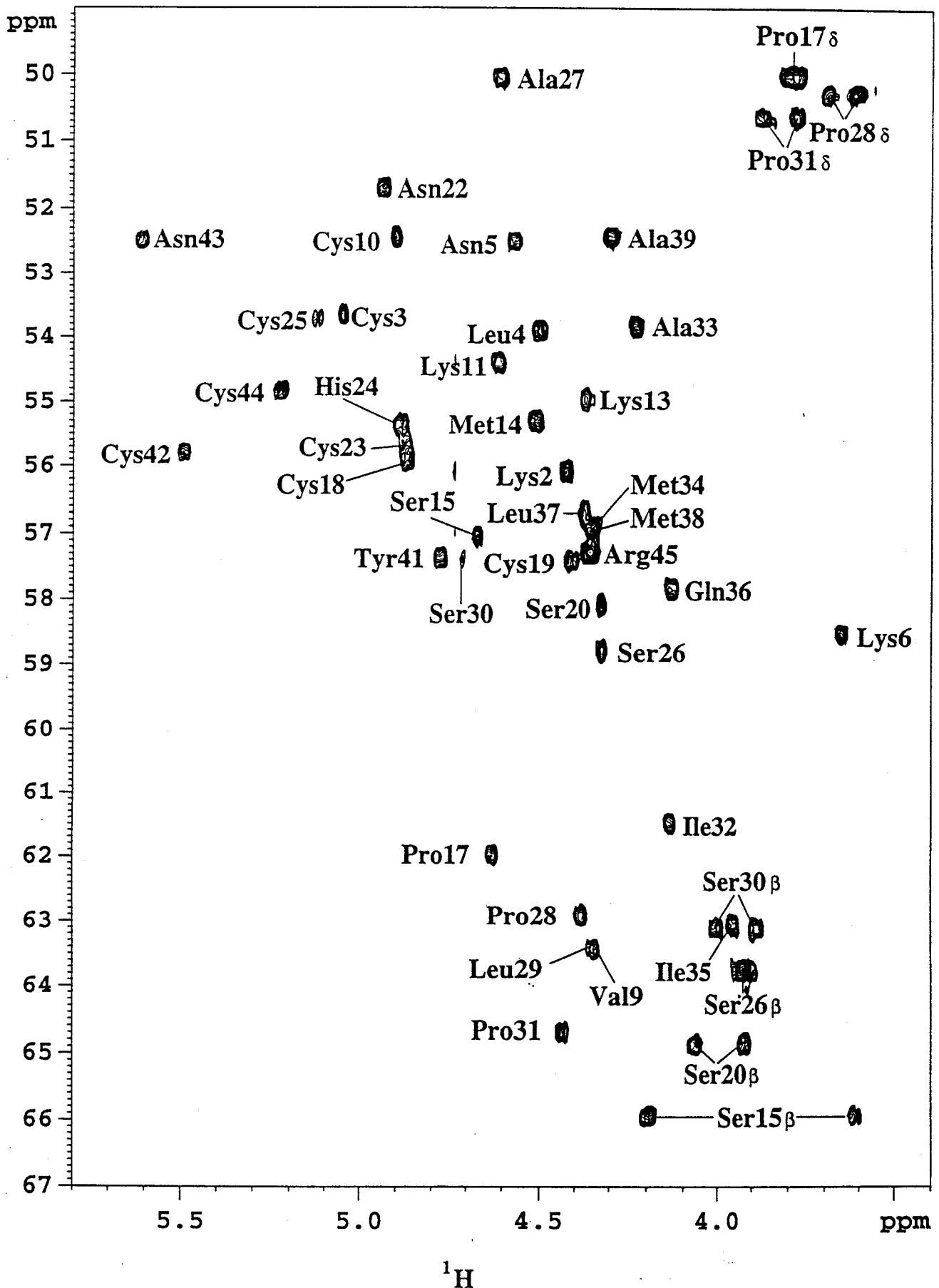


Figure III.2: Spectre ^1H - ^{13}C HSQC de la toxine d'araignée V50F17 dans D_2O , à pH = 2.9 et à 30°C montrant les résonances des carbones $\text{C}\alpha$ (hormis les quatre résidus glycine), des carbones $\text{C}\delta$ des trois résidus proline, et des carbones $\text{C}\beta$ des quatre résidus sérine.

dans D₂O en abondance naturelle en ¹³C. La figure III.2 montre le domaine H α -C α du spectre ¹H-¹³C HSQC. Ces spectres nous ont permis de confirmer l'attribution séquentielle et de lever les ambiguïtés sur l'attribution en ¹H des chaînes latérales. Les déplacements chimiques des ¹H et des ¹³C de la toxine d'araignée V50F17 à 30°C, et à pH = 2.9 sont reportés dans la table III.2.

2. Détermination de la structure secondaire

Les éléments de structure secondaire de la toxine V50F17 ont été déterminés à partir de l'analyse des déviations des déplacements chimiques en ¹H et en ¹³C (Wishart *et al.*, 1992; Wishart & Sykes, 1994), à partir de la mesure des constantes de couplage ³J_{NH-H α} sur le spectre DQF-COSY, par l'identification des protons amide échangeant lentement dans D₂O, et finalement par l'analyse de l'intensité des contacts NOE séquentiels, à moyenne et à longue distance (Wüthrich, 1986). Tous ces résultats sont reportés sur la figure III.3.

Le principal élément de structure secondaire de la toxine V50F17 est un feuillet de 3 brins β antiparallèles comprenant les résidus Gly7 à Lys11, Asn22 à Ser26, et Tyr41 à Arg45 représentant le premier β 2, le second β 3 et le troisième brin β 4 respectivement. Ces résidus présentent des déviations de déplacement chimique H α et C α , par rapport aux valeurs *random coil*, caractéristiques d'une structure de type étendue (Wishart *et al.*, 1992; Wishart & Sykes, 1994). Le feuillet de 3 brins β a été confirmé par l'identification de contacts NOE caractéristiques de forte intensité Val9(H α)-Asn43(H α), Cys23(H α)-Cys44(H α) et Cys25(H α)-Cys42(H α), mais également par des contacts NOE H α -NH et NH-NH non séquentiels (Figure III.4). De plus des constantes de couplage ³J_{NH-H α} supérieures à 9.5 Hz ont été mesurées pour les résidus Cys10, Lys11, Asn22, Cys25, Asn43 et Arg45. De même les expériences d'échange dans D₂O ont montré que les protons amides des résidus Glu8, Cys10, Asn43, Cys44 et Arg45 sont encore observables après 24 heures: nous nous attendons à ce que ces protons amide soient impliqués dans des liaisons

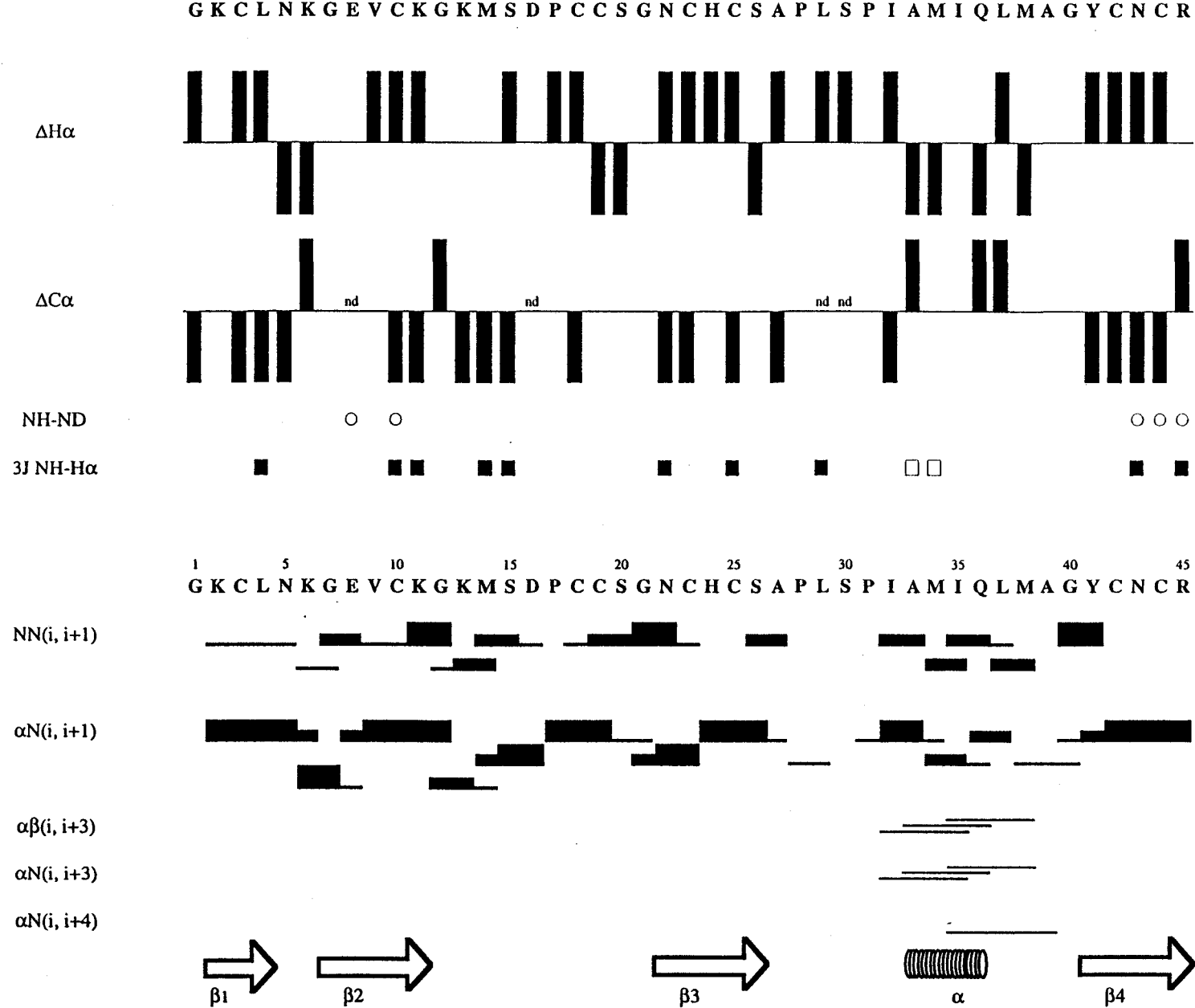


Figure III.3: Tableau résumant la structure secondaire de la toxine d'araignée V50F17. Il comprend les indices de déplacements chimiques des H α et C α (Wishart *et al.*, 1992; Wishart & Sykes, 1994) (nd signifie non déterminé), les protons amide échangeant lentement dans D₂O (notés par un O), les constantes de couplage $^3J_{\text{NH-H}\alpha}$ (carré ■ J > 8 Hz; carré □ J < 6Hz), et les contacts NOE séquentiels et non séquentiels caractéristiques pour la détermination de la structure secondaire.

hydrogènes qui stabilisent le feuillet des 3 brins β (Figure III.4). Nous remarquons que 5 des 8 cystéines de la toxine d'araignée V50F17 appartiennent au feuillet de brin β . De plus, elles se trouvent en vis à vis les unes par rapport aux autres dans les brins: Cys10 se trouve en face de Cys42 qui se trouve elle même à proximité de Cys25; Cys23 est en face de Cys44. Cette proximité spatiales des cystéines dans la structure secondaire va rendre non triviale la détermination des ponts disulfures.

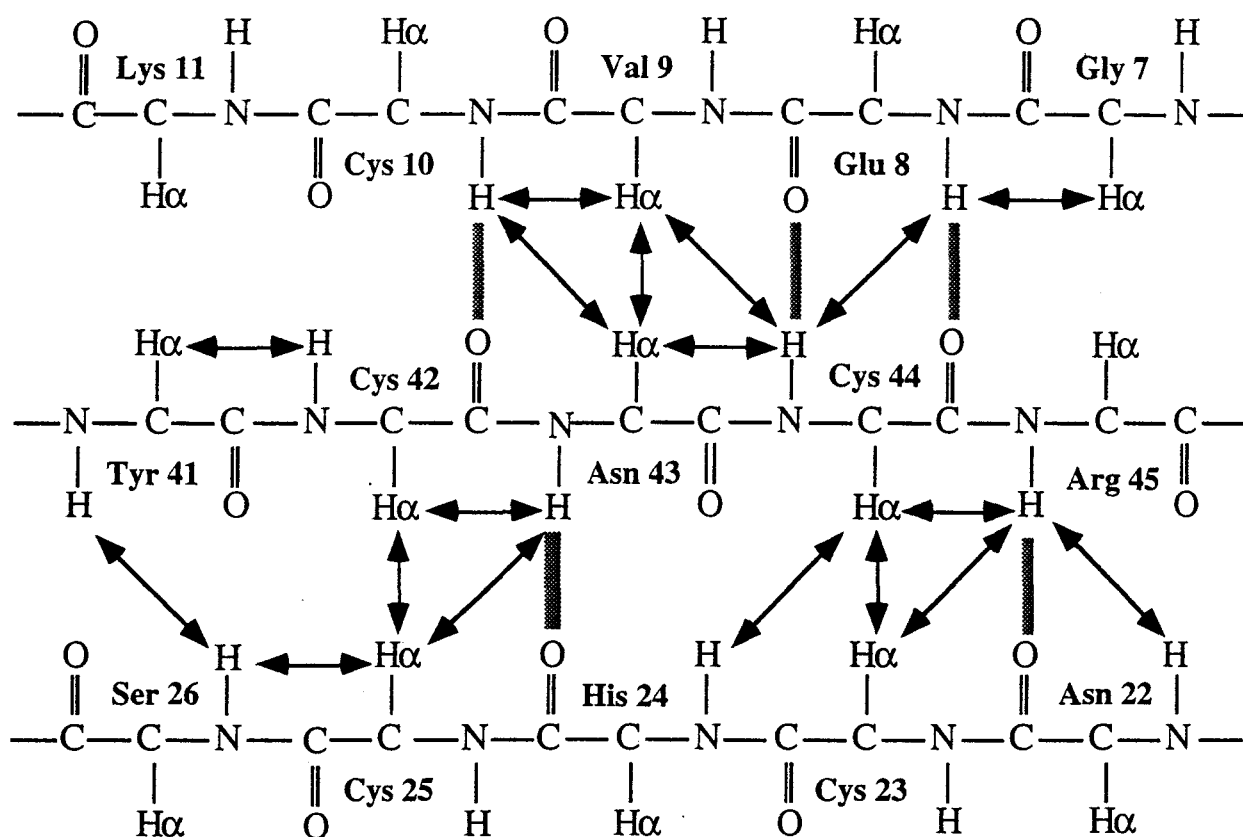


Figure III.4: Représentation schématique des contacts NOE séquentiels $\alpha N(i, i+1)$ et non séquentiels $H\alpha-H\alpha$, $H\alpha-NH$ et $NH-NH$, et des liaisons hydrogènes dans le feuillet des 3 brins β antiparallèles de la toxine d'araignée V50F17.

L'analyse de la structure secondaire de la protéine montre que la partie N-terminale, du résidu Lys2 à Asn5, présente une structure de type étendue. Ce domaine est caractérisé par une

succession d'indice +1 et -1 pour les $H\alpha$ et $C\alpha$ respectivement selon la méthode de Wishart (Wishart *et al.*, 1992; Wishart & Sykes, 1994). De plus des contacts NOE séquentiels, caractéristiques d'une structure de type étendue, $\alpha N(i, i+1)$ et $NH(i)-NH(i+1)$ respectivement forts et faibles ont été identifiés (Figure III.3). Ce domaine de structure étendue $\beta 1$ en l'extrémité N-terminale n'est pas connecté au feuillet des 3 brins β antiparallèles. Ce domaine ne fait pas partie du feuillet en raison d'une absence de contact NOE à longue distance entre ce segment en l'extrémité N-terminale et le feuillet.

Le second élément de structure secondaire identifié pour la toxine V50F17 est un petit domaine en hélice α du résidu Ile32 à Gln36. Cette hélice α appartient au domaine qui relie le second et le troisième brin du feuillet β antiparallèle. Ce domaine a été mis en évidence par une succession d'indice -1 pour les protons $H\alpha$, caractéristique d'une hélice α selon la méthode de Wishart, mais également par des contacts NOE d'intensité médium $NH(i)-NH(i+1)$ et par des contacts NOE d'intensité faible du type $\alpha\beta(i, i+3)$, $\alpha N(i, i+3)$, et un contact NOE faible du type $\alpha N(i, i+4)$ (Figure III.3).

3. Détermination des ponts disulfures par RMN

3.1 Calcul des poids statistiques W_{ij}

Nous avons calculé pour les 28 ponts disulfures potentiels de V50F17 (voir Annexe III.2) leur poids statistique W_{ij} selon la méthode Klaus (Klaus *et al.*, 1993). Pour ce calcul 100 structures non affinées obtenues par le programme X-PLOR ont été générées (voir § B.3). Les structures ont été calculées à partir d'un nombre total de 12 et 11 contraintes sur les angles dièdres ϕ et χ_1 respectivement. 466 contraintes de distance ont été introduites, parmi lesquelles 128 contraintes

NOE sont séquentielles et 115 sont à longue et moyenne distance. Les liaisons hydrogènes, les liens covalents entre les cystéines et les contraintes NOE entre cystéines ont été exclus pour le calcul des 100 structures (voir § B.4). Le poids statistiques W_{ij} des 28 ponts disulfures potentiels de la protéine sont reportés sur la figure III.5.

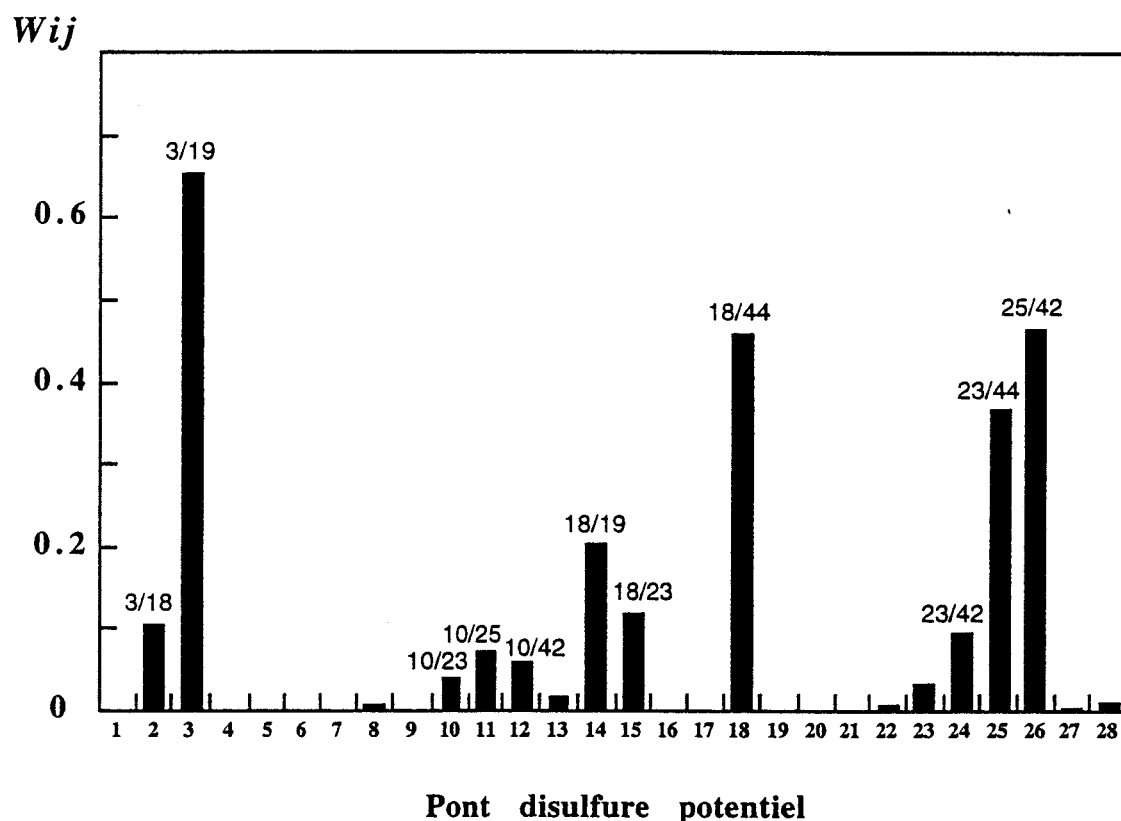


Figure III.5: Poids statistiques des 28 ponts disulfures potentiels de la toxine d'araignée V50F17, calculés à partir de 100 structures non affinées avec un paramètre de dispersion $s = 1.0$. Les ponts disulfures sont indiqués pour les poids statistiques les plus élevés.

La paire Cys3-Cys19 présente le poids statistique W_{ij} le plus élevé (0.65). Ensuite trois autres paires Cys18-Cys44, Cys23-Cys44 et Cys25-Cys42 présentent un W_{ij} supérieur à 0.35. Ces deux dernières paires correspondent à des cystéines en vis à vis et appartenant à deux brins du feuillet β antiparallèle (Figure III.4). C'est la proximité spatiale des cystéines 23 et 44, 25 et 42

dans la structure secondaire, qui est responsable de ces valeurs de W_{ij} élevées et relativement proches. Parmi les ponts disulfures contenant la cystéine 10, aucune paire ne se détache des unes des autres, elles présentent des W_{ij} similaires et faibles ($W_{ij} < 0.1$).

3.2 Calcul des poids statistiques W_p

Nous avons calculé et représenté sur le figure III.6 le poids statistique W_p pour les 105 combinaisons possibles de pont disulfure (voir Annexe III.3). Nous remarquons immédiatement que seules les combinaisons contenant la paire Cys3-Cys19 présentent un W_p non nul. Ceci nous permet déjà d'affirmer que le pont disulfure Cys3-Cys19 appartient à la combinaison native des ponts disulfures.

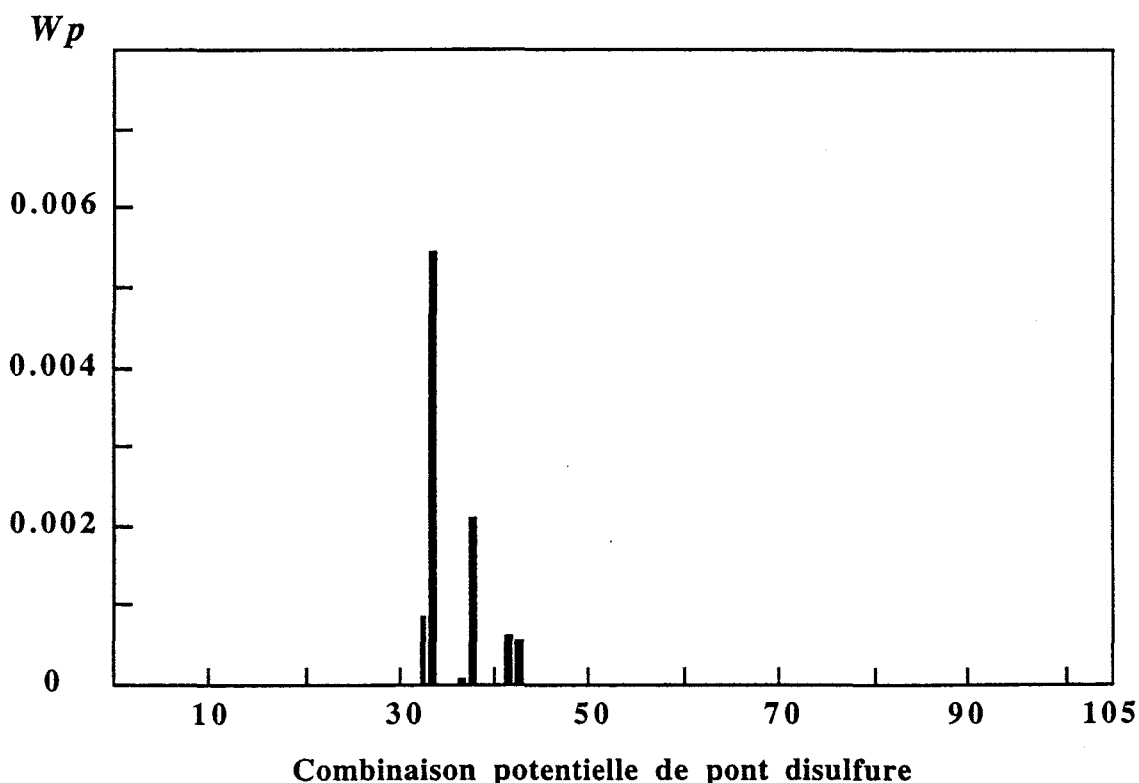


Figure III.6: Poids statistiques $W_p = \prod W_{ij}$ des 105 combinaisons potentielles de pont disulfure de la toxine d'araignée V50F17 (voir Annexe III.3), calculés à partir de 100 structures non affinées avec un paramètre de dispersion $s = 1.0$.

Parmi les 105 combinaisons potentiellement possibles (voir Annexe III.3), seules 15 d'entre elles sont maintenant à considérer. Le poids statistique de ces 15 combinaisons qui contiennent chacune la paire Cys3-Cys19 est reporté sur la figure III.7.

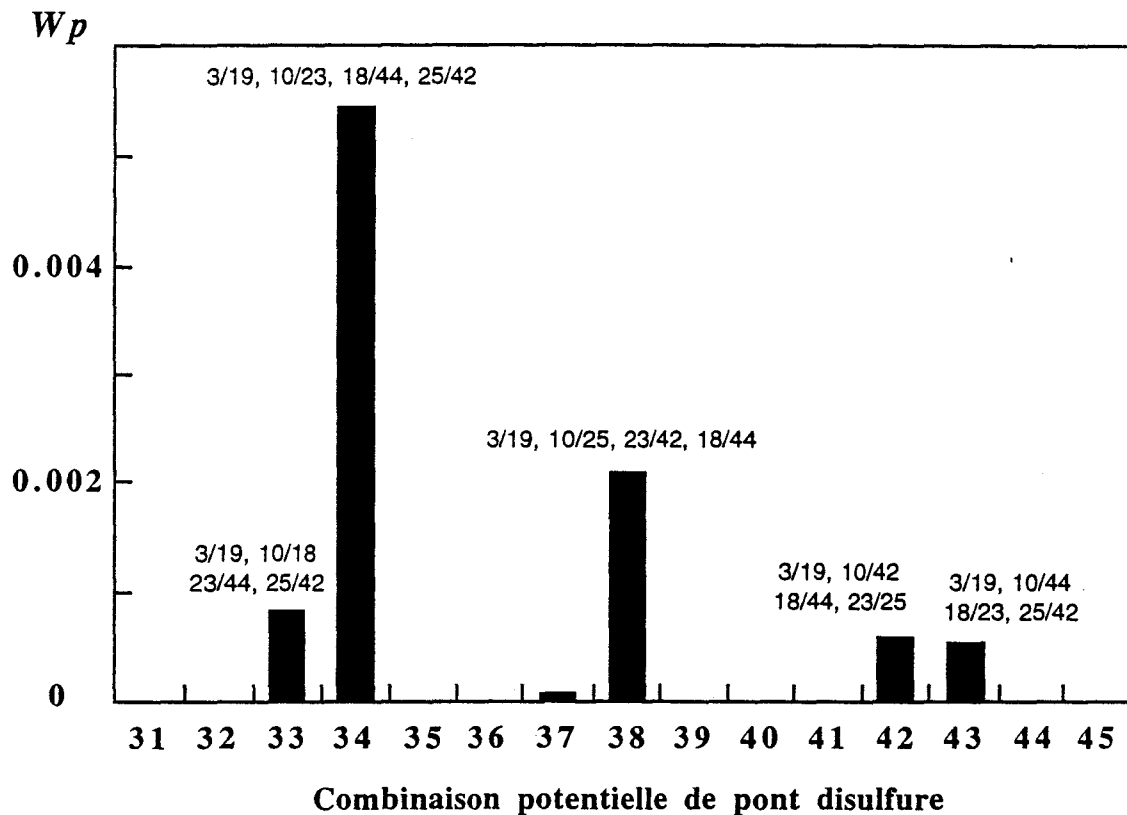


Figure III.7: Poids statistiques W_p des 15 combinaisons de pont disulfure contenant la paire Cys3-Cys19 de la toxine d'araignée V50F17 calculés à partir de 100 structures non affinées avec un paramètre de dispersion $s = 1.0$.

Nous remarquons immédiatement que la combinaison N°34 contenant les paires Cys3-Cys19, Cys10-Cys23, Cys18-Cys44, et Cys25-Cys42 présente le poids statistique W_p le plus élevé ($W_p = 5.4 \cdot 10^{-3}$). Néanmoins, quatre autres combinaisons (N°s: 38, 33, 42 et 43) présentent un W_p nettement plus faible mais cependant non négligeable, notamment la combinaison N°38 ($W_p = 2.1 \cdot 10^{-3}$). Cette dernière a en commun avec la combinaison de W_p le plus élevé la paire Cys18-

Cys44 (en plus de la paire Cys3-Cys19). La difficulté de séparer sans ambiguïté la combinaison de pont disulfure de l'état natif de la protéine parmi les 15 dernières combinaisons potentiellement possibles, vient du fait que Cys10, Cys18, Cys23, Cys25, Cys42 et Cys44 sont relativement proches spatialement les unes des autres, et que pour la paire Cys10-Cys23 le nombre de contact NOE entre les résidus flanquant Cys10 et Cys23 est très faible. L'ambiguïté a été levée et la combinaison N°34 a été confirmée grâce à l'attribution stéréospécifique des protons H β des cystéines et à partir des contacts NOE observés dans la partie aliphatique du spectre NOESY dans D₂O. En effet, nous avons identifié des contacts NOE caractéristiques entre cystéines, qui nous permettent de confirmer les appariements de la combinaison présentant le W_p le plus élevé (Klaus *et al.*, 1993). Selon la méthode de Klaus, seuls les contacts NOE de type H β /H β et H β /H α sont des contacts présentant des valeurs prédictives positives correspondant à des cystéines engagées en pont disulfure. Nous avons identifié des contacts NOE Cys3(H β^*)-Cys19(H β 1) et Cys3(H β^*)-Cys19(H β 2) faibles, et un contact NOE médium Cys3(H β^*)-Cys19(H α); un NOE faible Cys18(H β 2)-Cys44(H α); quatre contacts NOE faibles Cys25(H β 1)-Cys42(H α), Cys25(H β 2)-Cys42(H α), Cys25(H α)-Cys42(H β 1), et Cys25(H α)-Cys42(H β 2). Aucun contact caractéristique entre les protons H α et H β des Cys10 et Cys23 n'a été observé. Le calcul des poids statistiques W_{ij} et W_p , et les contacts NOE caractéristiques entre cystéines nous permettent d'affirmer que la combinaison de ponts disulfures de l'état natif de la toxine d'araignée V50F17 est: Cys3-Cys19, Cys10-Cys23, Cys18-Cys44, et Cys25-Cys42.

4. Détermination de la structure tridimensionnelle

Un nombre total de 494 contraintes NOE sur les distances a été introduit, comprenant 223 contraintes intrarésidu, 132 contraintes séquentielles, 134 contraintes non séquentielles et 5 contraintes correspondant aux liaisons hydrogènes. La distribution des contraintes NOE sur les distances dans la toxine d'araignée V50F17 est montrée sur la figure III.8.

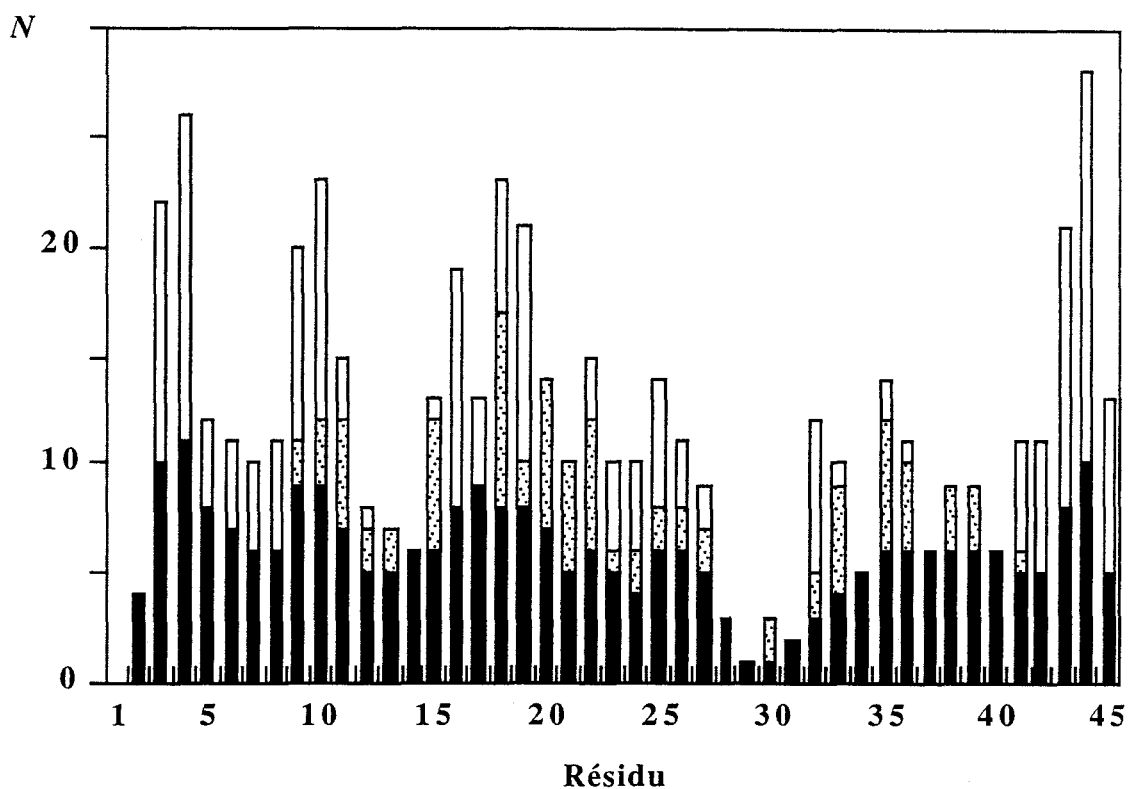


Figure III.8: Diagramme montrant le nombre N de contraintes NOE par résidu sur la séquence de la toxine d'araignée V50F17. Le nombre de contraintes NOE séquentielles, et de contraintes NOE entre acides aminés séparés dans la séquence par moins de 5 résidus ($|i-j| \leq 5$) et par plus de 5 résidus ($|i-j| > 5$) est respectivement représenté par des barres noires, pointillées et vides.

La combinaison de ponts disulfures de l'état natif de la toxine V50F17 (Cys3-Cys19, Cys10-Cys23, Cys18-Cys44, et Cys25-Cys42) déterminée par la méthode de Klaus a été introduite en termes de contraintes géométriques pour la génération de structures à l'aide du programme X-PLOR. 12 et 11 contraintes sur les angles dièdres ϕ et χ_1 ont été utilisées respectivement. De plus, 3 contraintes sur les angles dièdres ψ ont été introduites à partir de la détermination de la structure secondaire. Ces contraintes ont été estimées à partir de la constante de couplage $^1J_{\text{C}\alpha\text{-H}\alpha}$ mesurée de

l'expérience ^1H - ^{13}C HSQC non découplée (Vuister *et al.*, 1992, Mierke *et al.*, 1992), et concernent les résidus Ala33, Met34 et Gln36 qui se trouvent dans un domaine en hélice α : domaine considéré pour les angles ψ $-60^\circ(\pm 60^\circ)$.

Sur 100 structures générées par le programme X-PLOR, 15 structures sont acceptées sans aucune violation de NOE supérieure à 0.3 Å. Les caractéristiques énergétiques, géométriques et structurales de ces 15 structures sont reportées dans la table III.3.

A	
Energie totale (kcal mol ⁻¹)	114.2 ± 3.3
Energie de violation de NOE (kcal mol ⁻¹)	7.6 ± 0.7
Energie de violation d'angles dièdres (kcal mol ⁻¹)	0.15 ± 0.05
B	
<i>rmsd</i> (Å) sur les longueurs de liaison	0.00275 ± 0.0002
<i>rmsd</i> (Å) sur les angles de valence	0.69 ± 0.03
<i>rmsd</i> (Å) sur les angles impropres	0.42 ± 0.03
C	
<i>rmsd</i> (Å)	Tous les atomes du <i>backbone</i>
Structure totale	1.10 ± 0.21
Feuillet à 3 brins β antiparallèles $\beta_2, \beta_3, \beta_4$	0.58 ± 0.18
Hélice α (Ile32-Gln36)	0.28 ± 0.09
Ponts disulfures	
Cys3-Cys19, Cys10-Cys23	0.43 ± 0.11
Cys18-Cys44, Cys25-Cys42	

Table III.3: Caractéristiques énergétiques (A) et géométriques (B) des 15 structures acceptées ne présentant aucune violation de NOE supérieure à 0.3 Å. Calcul des *rmsd* (*root mean square deviation*) (C) pour des éléments structuraux différents lorsque les 15 structures sont superposées selon ces domaines particuliers.

L'analyse par le programme PROCHECK (Laskowski *et al.*, 1993) des angles dièdres (ϕ , ψ) des 15 structures acceptées montre que 53% des résidus se trouvent dans les régions les plus favorables du diagramme de Ramachandran, 39% dans les régions autorisées et 8% dans les régions généreusement autorisées. Aucun résidu n'est trouvé dans les régions interdites.

5. Description de la structure tridimensionnelle

L'analyse de la structure tridimensionnelle de la toxine d'araignée V50F17 montre qu'elle est constituée d'un segment en l'extrémité N-terminale (Lys2-Asn5) de structure étendue β 1, d'un feuillet de trois brins β antiparallèles β 2 (Gly7-Lys11), β 3 (Asn22-Ser26) et β 4 (Tyr41-Arg45), d'une boucle (Gly12-Gly21) contenant à ses extrémités deux tournants (Gly12-Ser15) et (Cys18-Gly21), et d'une large boucle (Ala27-Gly40) contenant 14 résidus dont 5 forment une hélice α (Ile32-Gln36). Cette dernière boucle relie les brins β 3 et β 4. Une structure tridimensionnelle en ruban de la toxine V50F17 est montrée sur la figure III.9.

Le feuillet des trois brins β

Le feuillet β antiparallèle est riche en cystéines: cinq des huit cystéines de la séquence se trouvent dans le feuillet (Cys10, Cys23, Cys25, Cys42 et Cys44) (Figure III.9). La topologie de ce feuillet a été identifié comme étant de type $(2x - 1)$ selon la nomenclature de Richardson (Richardson, 1981) (Figure III.10).

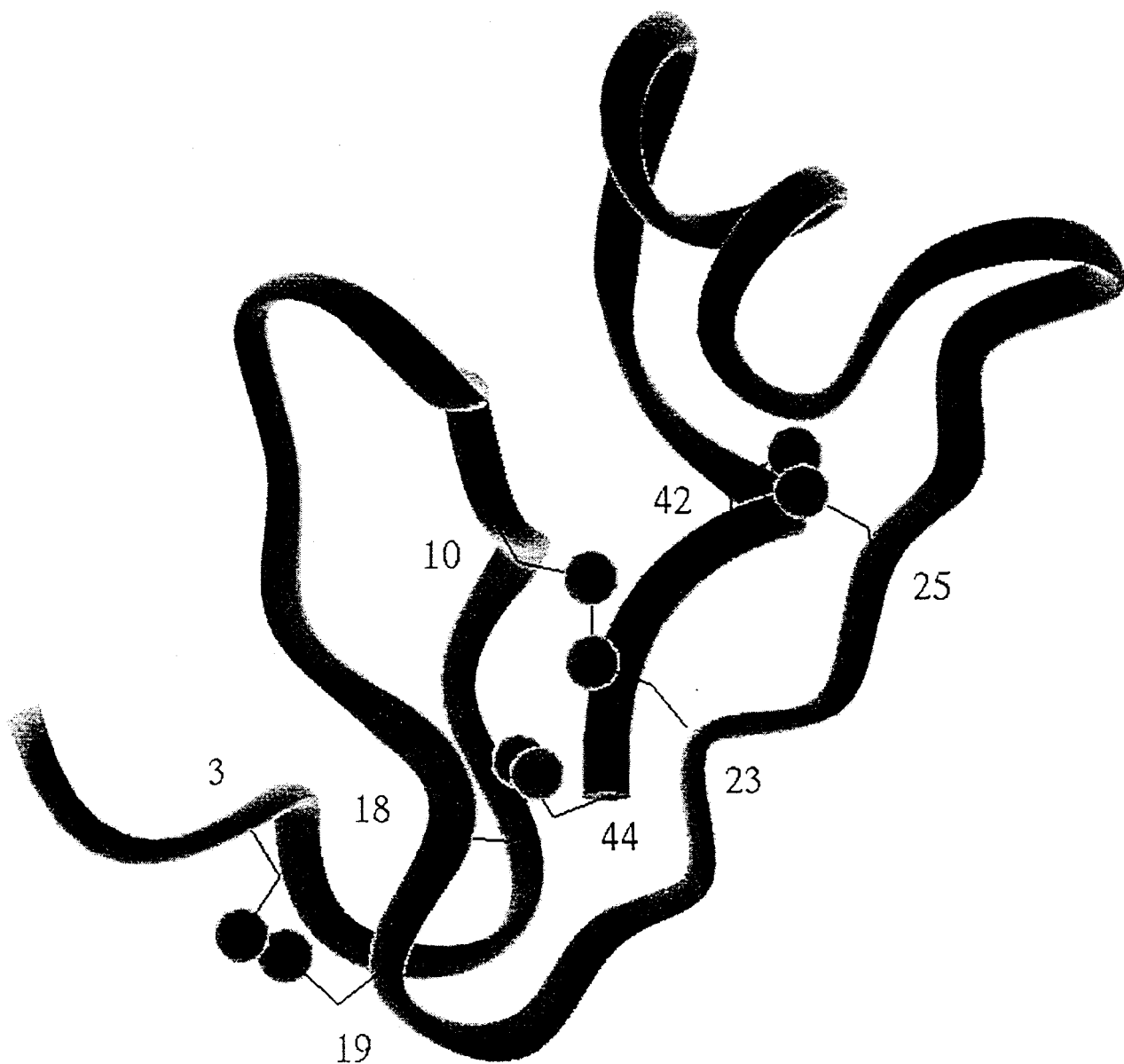


Figure III.9: Représentation sous forme de ruban du *backbone* de la structure tridimensionnelle de la toxine V50F17 isolée du venin de l'araignée *Segestria Florentina*. Le feuillet des trois β antiparallèles (β 2: Gly7-Lys11; β 3: Asn22-Ser26; β 4: Tyr41-Arg45) est représenté en blanc. Le domaine en hélice α est représenté en rouge. Les ponts disulfures (Cys3-Cys19), (Cys10-Cys23), (Cys18-Cys44) et (Cys25-Cys42) sont représentés en jaune.

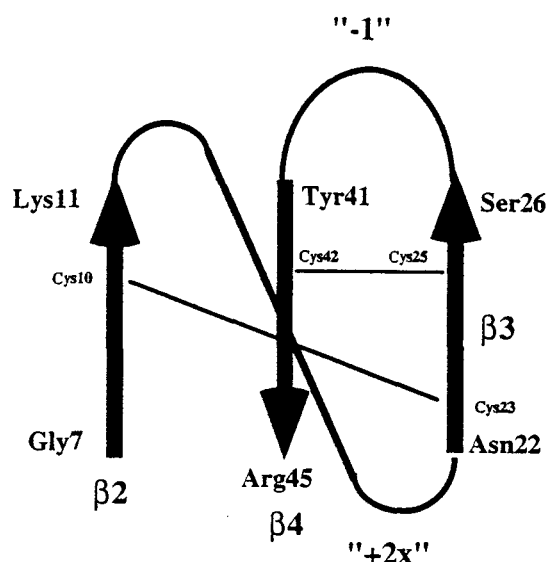


Figure III.10: Représentation schématique de la topologie $(2x - 1)$ du feuillet de trois brins β antiparallèles de la toxine d'araignée V50F17 (Richardson, 1981).

Les quatre ponts disulfures jouent un rôle très important dans la formation et la stabilisation de la structure globulaire de la toxine. Le pont disulfure (Cys10-Cys23) connecte les brins $\beta 2$ et $\beta 3$. Les brins $\beta 3$ et $\beta 4$ sont connectés par le pont disulfure (Cys25-Cys42), tandis que les ponts disulfures entre Cys3 et Cys19 et entre Cys18 et Cys44 connectent la première boucle (Gly12-Gly21) à la partie N-terminale de la molécule et au brin $\beta 4$ respectivement (Figure III.9). Le pont disulfure (Cys3-Cys19) est tourné vers l'extérieur de la molécule, alors que les trois autres ponts disulfures participent au coeur hydrophobe par leur chaîne latérale. Les quatre ponts disulfures sont extrêmement bien définis, et présentent lorsque les 15 structures sont superposées sur ces domaines un *rmsd* de $0.43 (\pm 0.11)$ Å (tous les atomes lourds du *backbone* des cystéines: N, C α et C) (Figure III.11). Le feuillet est très bien défini, il est stabilisé en plus des ponts disulfures par 5 liaisons hydrogènes, et présente lorsque les 15 structures acceptées sont superposées suivant les trois brins, un *rmsd* de $0.58 (\pm 0.18)$ Å (N, C α et C).

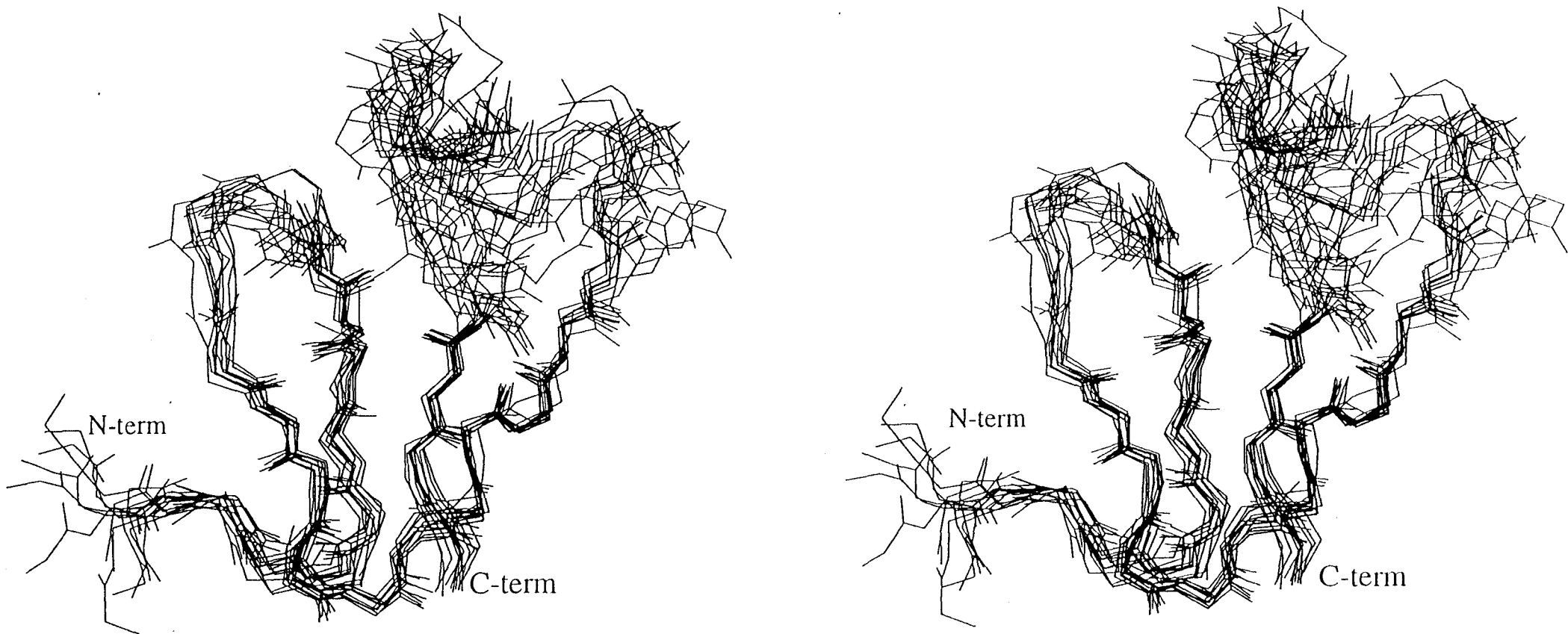


Figure III.11: Vue en stéréo de la superposition, suivant les atomes (N, C α , C) du *backbone*, des résidus du feuillet β antiparallèle pour les 15 structures acceptées avec aucune violation de NOE supérieure à 0.3 Å, pour la toxine V50F17 isolée du venin de l'araignée *Segestria Florentina*. Les ponts disulfures ne sont pas représentés.

Les tournants

Des contacts NOE caractéristiques d'un tournant de type β (Wüthrich, 1986) $\alpha N(i, i+2)$ et $NN(i, i+2)$ ont été identifiés entre les résidus Lys13 et Ser15 du tournant (Gly12-Ser15), et entre les résidus Cys19 et Gly21 du tournant (Cys18-Gly21). De plus dans les 15 structures acceptées, les distances $C\alpha(i)-C\alpha(i+3)$ entre ces mêmes résidus ont toutes été mesurées comme étant inférieures à 7 Å (première condition qui détermine la présence d'un tournant β) (Wilmot & Thornton, 1988). Néanmoins, les résidus centraux Lys13 et Met14, Cys19 et Ser20 des deux tournants présentent des angles dièdres (ϕ, ψ) dans une conformation hélicoïdale ($-60^\circ, -60^\circ$). Or dans la mesure où la seconde condition pour avoir un tournant β est justement que ces deux résidus centraux ne doivent pas être en conformation hélicoïdale, ces angles dièdres sont incompatibles avec une structure de type tournant β .

Un petit domaine en hélice α

Dans la boucle de 14 résidus (Ala27-Gly40) reliant les brins β_3 et β_4 du feuillet β antiparallèle, un petit domaine en hélice α à caractère très hydrophobe (Ile32-Gln36) a été identifié (Figures III.9 et III.12a). Cette boucle semble très flexible lorsque les 15 structures sont superposées suivant les trois brins du feuillet β . Le caractère flexible de la boucle vient du faible nombre de NOE entre les résidus charnières, c'est à dire aux extrémités de la boucle reliant les brins β_3 et β_4 . Ceci conduit à la présence de plusieurs conformations pour cette boucle. Cependant dans la famille de conformations, l'hélice α est extrêmement bien définie et présente un *rmsd* de 0.28 (± 0.09) Å (tous les atomes lourds du *backbone* de l'hélice) (Figure III.12b). Ce résultat montre que l'hélice α existe dans chacune des conformations de la molécule.

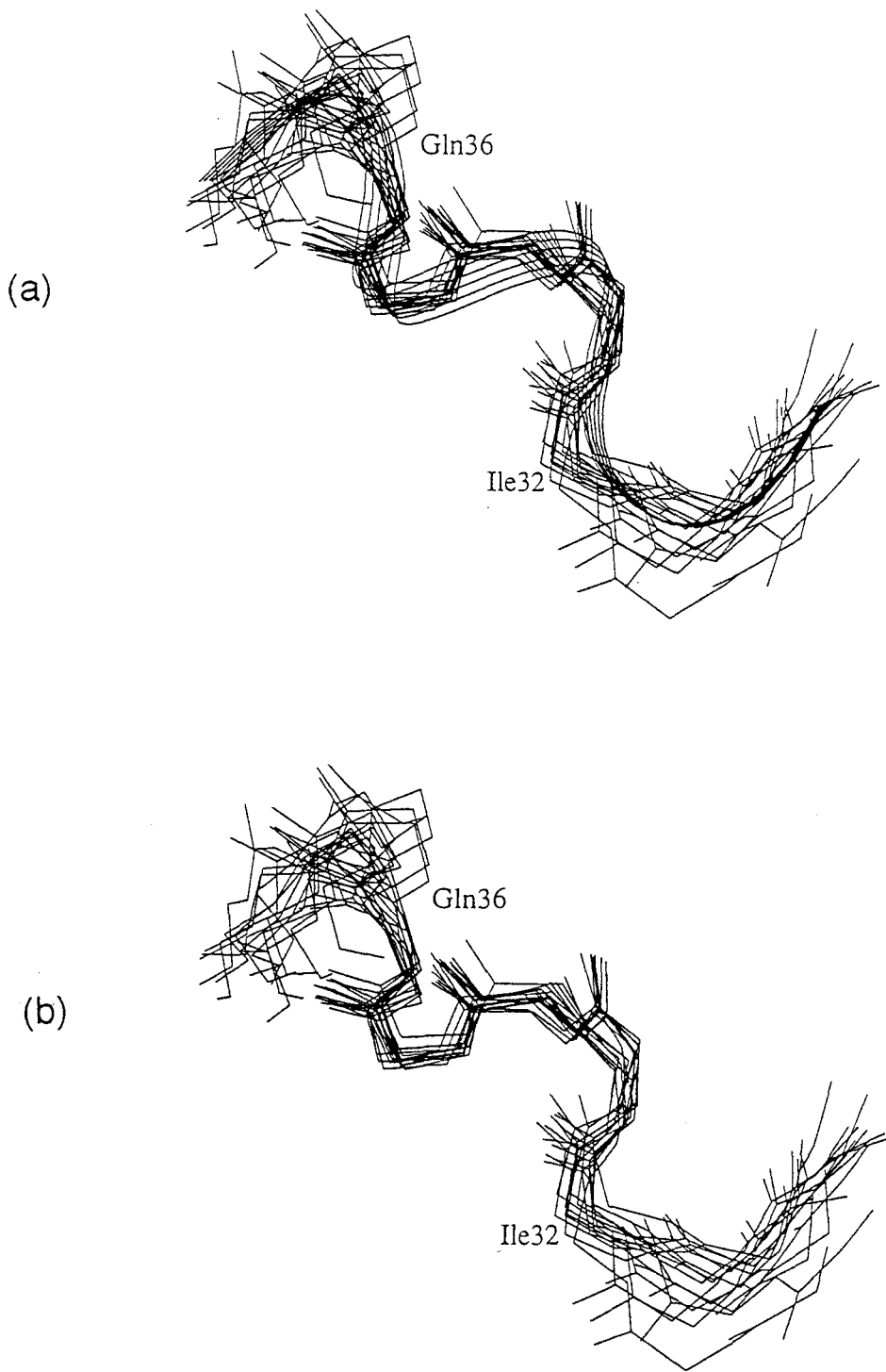


Figure III.12: (a) Représentation sous forme de ruban du domaine de la boucle (Ala27-Gly40) contenant l'hélice α (Ile32-Gln36). (b) Superposition suivant le *backbone* (N, C α , C) des résidus de l'hélice α (Ile32-Gln36) pour les 15 structures acceptées avec aucune violation de NOE supérieure à 0.3 Å, pour la toxine V50F17 isolée du venin de l'araignée *Segestria Florentina*.

Les parties N et C-terminales

La partie N-terminale (Lys2-Asn5) est relativement bien définie et est de structure étendue. La partie C-terminale quant à elle, appartient au brin $\beta 4$ du feuillet antiparallèle. La présence des cystéines Cys3 et Cys44 fait que les extrémités N et C-terminales de la structure sont stabilisées et bien définies.

D. Discussion

La toxine V50F17 isolée du venin de l'araignée *Segestria Florentina* agit spécifiquement sur les canaux calciques de type N. Elle présente une très faible homologie de séquence avec les autres toxines connues pour avoir une activité inhibitrice sur les canaux calciques (préfixe ω): la ω -Conotoxine GVIA (6 cystéines) isolée du venin du serpent de mer *Conus Geographus* qui agit spécifiquement sur les canaux calciques de type N (Oliviera *et al.*, 1984); la toxine SNX325 (8 cystéines) qui comme V50F17 est isolée du venin d'araignée *Segestria Florentina* qui agit sur les canaux de type N (Newcomb *et al.*, 1995); les ω -Agatoxine IVA et B (8 cystéines) isolées du venin d'araignée *Agelenopsis Aperta* qui agissent sur les canaux de type P (Mintz *et al.*, 1992).; la ω -Atracotoxine HV1 (6 cystéines) isolée du venin d'araignée *Hadronyche Versuta* qui contrairement aux toxines citées précédemment n'agit pas sur les canaux calciques des vertébrés mais sur ceux des insectes (Fletcher *et al.*, 1997). De même toutes ces toxines ne présentent que peu d'homologie entre elles. Néanmoins, elles ont toutes en commun une même localisation des résidus cystéine dans la séquence primaire (Table III.1). Dans la toxine d'araignée V50F17 les appariements entre cystéines déterminés par RMN correspondent exactement à ceux existant dans toutes ces neurotoxines, ce qui conforte les résultats obtenus par la méthode de Klaus (Klaus *et al.*, 1993). Dans la ω -Conotoxine GVIA et la ω -Atracotoxine HV1 qui ne contiennent que 6 cystéines, les appariements sont identiques à ceux de la toxine V50F17 qui présente la particularité d'avoir un pont disulfure supplémentaire (Cys25-Cys42), se situant aux extrémités des brins $\beta 3$ et $\beta 4$ reliés

par une boucle de 14 résidus. A défaut de partager une homologie dans leur séquence primaire (hormis les cystéines), toutes ces neurotoxines dont V50F17 présentent un motif structural hautement conservé. Ce motif est un feuillet de trois brins β antiparallèles reliés par des boucles de longueur variable d'une toxine à l'autre. Le feuillet β est de topologie $(2x - 1)$ et est riche en résidus cystéines. Le pont disulfure ((Cys3-Cys19) dans V50F17) reliant le premier résidu cystéine et le quatrième est systématiquement orienté vers l'extérieur du coeur de la protéine. Les deux et trois autres ponts disulfures, respectivement chez la ω -Conotoxine GVIA (Davis *et al.*, 1993) et chez la ω -Atracotoxine HV1 (Fletcher *et al.*, 1997) d'une part et chez la toxine V50F17 et les ω -Agatoxines IVA et B (Kim *et al.*, 1995; Reily *et al.*, 1995) d'autre part, se trouvent situés dans le coeur hydrophobe de la protéine.

La toxine d'araignée V50F17 présente une différence structurale significative par rapport aux autres toxines qui agissent spécifiquement sur les canaux calciques. Cette différence se situe dans la longueur de la boucle reliant les deux derniers brins du feuillet β antiparallèle (voir Table III.1): chez la toxine V50F17 cette boucle contient 14 résidus. Chez les ω -Agatoxines IVA et B la boucle reliant les deux derniers brins est constituée de 6 résidus qui n'adoptent pas de conformation particulière (Kim *et al.*, 1995; Reily *et al.*, 1995). Chez les ω -Conotoxine GVIA et ω -Atracotoxine HV1, cette boucle est constituée de quatre et cinq résidus respectivement qui adoptent une conformation non structurée et de type tournant β I respectivement (Davis *et al.*, 1993; Fletcher *et al.*, 1997). Dans la toxine V50F17, cette boucle (Ala27-Gly40), dont la flexibilité a été observée dans les structures tridimensionnelles, possède un domaine parfaitement bien structuré. Ce domaine est une hélice α à caractère très hydrophobe (Ile32-Ala-Met-Ile-Gln36). La présence d'un élément de structure secondaire n'avait jusqu'à présent jamais été observée dans la boucle reliant les deux derniers brins du feuillet β antiparallèle chez les toxines ayant une activité sélective sur les canaux calciques. Comme la conformation globale de ces neurotoxines est similaire, il semble raisonnable de penser qu'elles agissent de manière très similaire. Cependant la longueur de cette boucle étant

boucle étant variable d'une toxine à une autre, la structure de ce domaine pourrait être responsable de la sélectivité de la toxine pour un des canaux calciques de type donné.

E. Conclusion

Nous avons déterminé la structure tridimensionnelle en solution de la toxine V50F17 isolée du venin d'araignée *Segestria Florentina*. Cette toxine agit spécifiquement sur les canaux calciques de type N. Elle présente le motif structural caractéristique des toxines qui agissent sur les canaux calciques: un feuillet de trois brins β antiparallèle de topologie $(2x - 1)$. Dans la boucle reliant le brin β_3 et β_4 un domaine structuré a été pour la première fois identifié. Ce domaine est une hélice α à caractère très hydrophobe. Le taux d'homologie élevé de la séquence de la toxine d'araignée V50F17 dans la famille des toxines V50, suggère que la structure tridimensionnelle de V50F17 représente une structure canonique pour cette famille de toxines.

F. Références

- Auguste, P. Hugues, M., Mourre, C.; Moinier, D.; Tartar, A.; Lazdunski, M. *Biochemistry* **1992**, *31*, 648-654.
- Bontems, F.; Roumestand, C.; Gilquin, B.; Ménez, A.; Toma, F. *Science* **1991**, *254*, 1521-1523.
- Braunschweiler, L.; Ernst, R. R. *J. Magn. Reson.* **1983**, *53*, 521-528.
- Brünger, A. T. *XPLOR Version 3.1 Manual*, Yale University, New Haven, CT, **1992**.
- Davis, D. G.; Bax, A. *J. Am. Chem. Soc.* **1985**, *107*, 2820-2821.
- Davis, J. H.; Bradley, E. K.; Miljanich, G. P.; Nadasdi, L.; Ramachandran, J.; Basus, V. J. *Biochemistry* **1993**, *32*, 7396-7405.
- Debin, J. A.; Maggio, J. E.; Strichartz, G. R. *Am. J. Physiol. Soc.* **1993**, *264*, C369.
- Dhalluin, C.; Wieruszkeski, J.-M.; Lippens, G. *J. Magn. Reson. Series B* **1996**, *111*, 168-170.
- Fletcher, J. I.; Smith, R.; O'Donoghue, S. I.; Nilges, M.; Connor, M.; Howden, M. E. H.; Christie, M. J.; King, G. F. *Nature Struct. Biol.* **1997**, *4*, 560-566.
- Gray, W. R.; Oliviera, B. M.; Cruz, L. J. *Ann. Rev. Biochem.* **1988**, *57*, 665-700.
- Jeener, J.; Meier, B. H.; Bachmann, P.; Ernst, R. R. *J. Chem. Phys.* **1979**, *71*, 4546-4553.
- Karplus, M. *J. Chem. Phys.* **1959**, *30*, 11-15.
- Kim, J.; Konishi, S.; Iwai, H.; Kohno, T.; Gouda, H.; Shimada, I.; Sato, K.; Arata, Y. *J. Mol. Biol.* **1995**, *250*, 659-671.
- Klaus, W.; Broger, C.; Gerber, P.; Senn, H. *J. Mol. Biol.* **1993**, *232*, 897-906.
- Kopeyan, C.; Martinez, G.; Rochat, H. *FEBS Lett.* **1985**, *181*, 211-217.
- Kumar, A.; Ernst, R. R.; Wüthrich, K. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1980**, *95*, 1-6.
- Laskowski, R. A.; MacArthur, M. W.; Moss, D. S.; Thornton, J. M. *J. Appl. Crystallog.* **1993**, *26*, 283-291.
- Lippens, G.; Dhalluin, C.; Wieruszkeski, J.-M. *J. Biol. NMR*, **1995**, *5*, 327-331.

- Marion, D.; Wüthrich, K. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1983**, *113*, 967-974.
- Mierke, D. F.; Grdadolnik, S. G.; Kessler, H. *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 8283-8284.
- Mintz, E. M.; Venema, Y. J.; Swiderek, K. M.; Lee, T. D.; Bean, B. P.; Adams, M. E. *Nature* **1992**, *355*, 827-829.
- Müller, N.; Ernst, R. R.; Wüthrich, K. *J. Am. Chem. Soc.* **1986**, *108*, 6482-6492.
- Newcomb, R.; Palma, A.; Fox, J.; Gaur, S.; Lau, K.; Chung, D.; Cong, R.; Bell, J. R.; Horne, B.; Nadashi, L.; Ramachandran, J. *Biochemistry* **1995**, *34*, 8341-8347.
- Oliviera, B. M.; McIntosh, J. M.; Cruz, L. J.; Luque, F. A.; Gray, W. R. *Biochemistry* **1984**, *23*, 5087-5090.
- Omecinsky, D. O.; Holub, K. E.; Adams, M. E.; Reily, M. D. *Biochemistry* **1996**, *35*, 2836-2844.
- Pardi, A.; Billeter, M.; Wüthrich, K. *J. Mol. Biol.* **1984**, *180*, 741-751.
- Piotto, M.; Saudek, V.; Sklenar, V. *J. Biol. NMR* **1992**, *2*, 661-665.
- Reily, M. D.; Venkataraman, T.; Adams, M. E. *J. Biol. NMR* **1995**, *5*, 122-132.
- Richardson, *Adv. Prot. Chem.* **1981**, *34*, 167-339.
- Verlet, L. *Phys. Rev.* **1967**, *159*, 98.
- Vuister, G. V.; Delaglio, F.; Bax, A. *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 9674-9675.
- Wagner, G.; Braun, W.; Havel, T. F.; Schaumann, T.; Go, N.; Wüthrich, K. *J. Mol. Biol.* **1987**, *196*, 611-639.
- Wider, G.; Wüthrich, K. *J. Magn. Reson. Series B* **1993**, *102*, 239-241.
- Wilmot, C. M.; Thornton, J. M. *J. Mol. Biol.* **1988**, *203*, 221-232.
- Wishart, D. S.; Sykes, B. D.; Richards, F. M. *Biochemistry* **1992**, *31*, 1647-1651.
- Wishart, D. S.; Sykes, B. D. *J. Biomol. NMR* **1994**, *4*, 171-180.
- Wüthrich, K. *NMR of Proteins and Nucleic Acids*, John Wiley and Sons, New York, **1986**.

Annexes

Table III.2: Tableau des déplacements chimiques des ^1H et ^{13}C à 30°C
de la toxine d'araignée V50F17 (pH = 2.9)

Résidu	H ^N	C ^α	C ^β	Autres
Gly 1	-	43.08 (3.87*)		
Lys 2	8.51	56.13 (4.41)	33.31 (1.83 1.74)	C ^γ 24.64 (1.41*); C ^δ 28.91 (1.71*); C ^ε 41.80 (2.99*)
Cys 3	8.25	53.71 (5.04)	42.89 (3.03*)	
Leu 4	9.27	53.99 (4.50)	44.15 (2.06 1.34)	C ^γ 26.48 (1.44); C ^δ 26.18 (0.90); C ^ε 22.28 (0.84)
Asn 5	8.65	52.61 (4.57)	39.85 (2.95 2.74)	NH ₂ 7.65 7.03
Lys 6	8.35	58.61 (3.65)	32.33 (1.83 1.67)	C ^γ 24.71 (1.45 1.30); C ^δ 29.42 (1.75*); C ^ε 41.80 (3.00*)
Gly 7	9.29	44.93 (4.46 3.64)		
Glu 8	7.84	nd (4.37)	nd (2.53 2.43)	C ^γ nd (2.18 2.11)
Val 9	8.43	63.48 (4.38)	31.98 (1.95)	C ^γ 22.24 (1.11); C ^γ 21.20 (0.98)
Cys 10	8.00	52.56 (4.89)	48.14 (3.45 3.18)	
Lys 11	8.36	54.47 (4.58)	33.91 (1.98 1.30)	C ^γ 25.26 (1.35 1.26); C ^δ 29.63 (1.63 1.57); C ^ε 42.02 (2.88*)
Gly 12	7.66	46.30 (3.99 3.72)		
Lys 13	8.76	55.05 (4.35)	32.13 (1.93 1.84)	C ^γ 24.91 (1.50*); C ^δ 28.91 (1.71*); C ^ε 41.80 (3.00*)
Met 14	8.04	55.42 (4.50)	31.74 (2.29 2.15)	C ^γ 32.72 (2.67 2.52)
Ser 15	7.75	57.12 (4.64)	65.96 (4.15 3.63)	
Asp 16	8.32	nd (4.82)	nd (2.78 2.45)	
Pro 17	-	62.03 (4.63)	32.01 (2.28*)	C ^γ 26.95 (2.10 1.92); C ^δ 50.09 (3.77*)
Cys 18	9.13	55.97 (4.85)	37.07 (3.35 2.41)	
Cys 19	10.42	57.51 (4.41)	38.88 (3.25 2.83)	
Ser 20	8.97	58.11 (4.34)	64.92 (4.05 3.91)	

Gly 21	7.83	45.14 (4.25 3.76)		
Asn 22	8.04	51.78 (4.93)	39.57 (2.98 2.54)	NH ₂ 7.44 6.80
Cys 23	8.67	55.69 (4.93)	38.40 (3.21 2.89)	
His 24	8.62	55.45 (4.86)	30.08 (3.45 2.97)	C ^δ nd (7.33) ; C ^ε nd (8.66)
Cys 25	8.75	53.78 (5.12)	43.68 (3.18 2.70)	
Ser 26	8.59	58.84 (4.34)	63.79 (3.91*)	
Ala 27	8.25	50.18 (4.60)	18.54 (1.26)	
Pro 28	-	62.92 (4.38)	27.25 (2.20*)	C ^γ 27.26 (1.94*); C ^δ 50.40 (3.68 3.60)
Leu 29	7.88	nd (4.44)	42.29 (1.65 1.59)	C ^γ 27.06 (1.64); C ^δ 24.95 (0.93); C ^δ 23.39 (0.88)
Ser 30	nd	nd (4.73)	63.11 (4.00 3.88)	
Pro 31	-	64.71 (4.43)	31.85 (2.35 1.96)	C ^γ 27.68 (2.04*); C ^δ 50.76 (3.87 3.77)
Ile 32	7.58	61.54 (4.14)	38.10 (1.91)	C ^γ 27.55 (1.44 1.23); C ^{mγ} 17.70 (0.91); C ^δ 12.49 (0.85)
Ala 33	8.03	53.89 (4.23)	18.65 (1.44)	
Met 34	8.09	57.05 (4.36)	32.34 (2.11*)	C ^γ 32.25 (2.62*)
Ile 35	7.59	63.06 (3.96)	38.10 (2.00)	C ^γ 28.09 (1.58 1.23); C ^{mγ} 17.32 (0.83); C ^δ 12.82 (0.89)
Gln 36	8.07	57.88 (4.14)	28.93 (2.21 2.10)	C ^γ 34.17 (2.48 2.32); NH ₂ 7.36 6.68
Leu 37	8.23	56.79 (4.36)	42.50 (1.78 1.64)	C ^γ 29.06 (1.64); C ^δ 25.19 (0.90); C ^δ 24.42 (0.85)
Met 38	7.94	57.05 (4.36)	32.09 (2.10*)	C ^γ 32.29 (2.71 2.60)
Ala 39	7.97	52.54 (4.29)	19.17 (1.33)	
Gly 40	7.75	45.62 (3.96*)		
Tyr 41	7.99	57.44 (4.76)	38.78 (3.34 2.88)	C ^δ 124.97 (7.12); C ^ε 110.37 (6.83)
Cys 42	8.76	55.86 (5.48)	48.34 (3.66 2.56)	
Asn 43	8.60	52.55 (5.58)	42.88 (2.34*)	NH ₂ 6.94 6.78
Cys 44	8.90	54.93 (5.21)	37.32 (3.33 2.97)	
Arg 45	8.95	57.36 (4.35)	32.34 (1.98 1.65)	C ^γ 27.64 (1.65*); C ^δ 43.37 (3.09 2.96); NH ^ε 7.03

Annexe III.1 Génération de structures moléculaires par le programme X-PLOR

A.III.1.1 Génération d'une structure arbitraire

Dans une première étape une structure de conformation étendue arbitraire est calculée avec une géométrie idéale. Ce calcul utilise uniquement toutes les informations moléculaires liées à la structure primaire de la molécule. Aucune contrainte de distance, d'angle dièdre, de liaison hydrogène ou de pont disulfure n'est utilisée pour ce calcul.

A.III.1.2 La procédure *Distance Geometry*

Dans une seconde étape, la structure arbitraire est utilisée dans la procédure appelée *Distance Geometry* qui génère des structures tridimensionnelles "grossières" qui respectent la topologie de la molécule (les longueurs de liaison, les angles de valence), et l'ensemble des contraintes conformationnelles introduites telles que les contraintes sur les distances issues des NOE et les contraintes sur les angles dièdres. Les ponts disulfures ne sont pas introduits en terme de liaisons covalentes mais en tant que contraintes de distance très sévères entre les atomes de soufre des cystéines en pont disulfure [$1.92 \text{ \AA} < d < 2.12 \text{ \AA}$].

La construction de ces structures repose sur un algorithme traduisant les contraintes de distance en coordonnées cartésiennes. Comme toutes ces contraintes viennent d'une intégration approximative des intensités des pics NOE, des problèmes peuvent se présenter. L'algorithme contient pour cette raison un test basé sur l'inégalité triangulaire: pour trois atomes i , j et k nous devons avoir $d(i, j) < d(i, k) + d(k, j)$, où $d(i, j)$ représente la distance entre les atomes i et j . Cette relation montre que dans le calcul, les distances entre atomes ne seront pas indépendantes les unes des autres. Contraindre des distances signifie que nous allons restreindre les distances à se trouver dans un intervalle. Pour chaque paire d'atomes (pour lesquels des contraintes de distance sont imposées), nous définissons un intervalle dont la limite inférieure correspond à la somme des

rayons de van der Waals des deux atomes, et où la limite supérieure est donnée par l'intensité du contact NOE observé entre ces deux noyaux.

Systématiquement nous commençons par fixer une distance aléatoire entre les atomes i et j prise dans l'intervalle imposé par la contrainte, la position de l'atome k sera déterminée en respectant à la fois les distances $d(i, k)$ et $d(k, j)$ et l'inégalité triangulaire. Ainsi la position de chaque atome (pour lequel une contrainte existe) dans la structure sera déterminée. Cette procédure sera répétée autant de fois que l'on désire de structures. Les structures obtenues par ce calcul sont très "grossières", et ont des énergies très élevées car pour l'instant aucune considération de l'énergie de la conformation de la molécule n'est prise en compte. Ces structures pour être affinées vont être soumises à une dynamique moléculaire.

A.III.1.3 La procédure de *Distance Geometry* combinée avec une dynamique moléculaire

3.1 La dynamique moléculaire

La dynamique moléculaire consiste à apporter de l'énergie cinétique à la molécule de manière à lui permettre d'explorer son espace conformationnel et ainsi à déterminer la conformation de plus basse énergie pour la molécule. Elle est basée sur la résolution des équations de Newton pour tous les atomes i de la molécule:

$$\mathbf{F}_i = m_i \frac{d^2 \mathbf{r}_i}{dt^2} = - \frac{\partial U_{\text{totale}}}{\partial \mathbf{r}_i}$$

\mathbf{F}_i représente la force appliquée sur l'atome i (de masse m_i) due à l'ensemble des interactions que l'atome i a avec les autres atomes; $d^2 \mathbf{r}_i / dt^2$ est son accélération; U_{totale} est l'énergie potentielle de la molécule; $\partial U_{\text{totale}} / \partial \mathbf{r}_i$ est le gradient d'énergie potentielle de l'atome i .

Lorsque l'accélération est connue pour chaque atome, il est possible de déterminer leur nouvelles coordonnées en utilisant l'algorithme de Verlet (Verlet, 1967):

$$\mathbf{r}_i(t + \Delta t) = 2 \mathbf{r}_i(t) - \mathbf{r}_i(t - \Delta t) + \frac{d^2 \mathbf{r}_i}{dt^2}(t) \Delta t^2$$

Les coordonnées sont calculées tous les intervalles Δt (de l'ordre la femtoseconde: 10^{-15} s)

Pour chaque étape Δt de la dynamique moléculaire, nous calculerons l'énergie potentielle atomique, nous pourrons obtenir l'accélération par dérivation analytique du potentiel atomique et ainsi déduire les nouvelles coordonnées par l'algorithme de Verlet.

Le terme de l'énergie potentielle totale de la molécule U_{totale} dans le programme X-PLOR comprend quatre composantes.

$$U_{\text{totale}} = E_{\text{covalente}} + E_{\text{répulsion}} + E_{\text{NOE}} + E_{\text{dihédre}}$$

La première composante, $E_{\text{covalente}}$ décrit l'énergie appliquée pour maintenir les longueurs des liaisons atomiques correctes, ainsi que les angles de valence, la chiralité et la planéarité.

$$E_{\text{covalente}} = \sum_{\text{liaisons}} k_b (r - r_0)^2 + \sum_{\text{angles}} k_\theta (\theta - \theta_0)^2 + \sum_{\text{impropres}} k_\omega (\omega - \omega_0)^2$$

r_0 , θ_0 et ω_0 représentent respectivement les valeurs à l'équilibre pour les longueurs de liaisons, les angles de valence et les angles de torsion impropres des liens peptidiques. k_b , k_θ et k_ω sont les constantes de force correspondantes.

La seconde composante, $E_{\text{répulsion}}$ permet d'éviter le recouvrement des atomes (van der Waals).

$$E_{\text{répulsion}} = \sum_{\substack{\text{rayons} \\ \text{de vdW}}} \epsilon_{\text{répulsion}}$$

$$\text{avec } \epsilon_{\text{répulsion}} = k_{\text{vdW}} (s^2 r_{\text{min}}^2 - r^2)^2 \quad \text{si } r < s r_{\text{min}}$$

$$\epsilon_{\text{répulsion}} = 0 \quad \text{si } r \geq s r_{\text{min}}$$

k_{vdW} est la constante de force, r_{min} est le rayon de van der Waals de l'atome et s un paramètre permettant de moduler le rayon de van der Waals au cours de la dynamique.

La troisième composante, E_{NOE} correspond aux contraintes imposées sur les distances qui sont traduites en terme énergétique:

$$E_{\text{NOE}} = \sum_{\text{contraintes}} \epsilon_{\text{NOE}}$$

$$\text{avec } \epsilon_{\text{NOE}} = k_{\text{NOE}} (r - d_{\text{min}})^2 \quad \text{si } r < d_{\text{min}}$$

$$\epsilon_{\text{NOE}} = 0 \quad \text{si } d_{\text{min}} < r < d_{\text{max}}$$

$$\epsilon_{\text{NOE}} = k_{\text{NOE}} (r - d_{\text{max}})^2 \quad \text{si } r > d_{\text{max}}$$

k_{NOE} est la constante de force, d_{min} et d_{max} sont les bornes de l'intervalle de distance de la contrainte NOE.

La quatrième composante de l'énergie potentielle de la molécule, $E_{\text{dihédre}}$ correspond aux contraintes imposées sur les angles diédres qui sont traduits en terme énergétique:

$$E_{\text{dihédre}} = \sum_{\text{contraintes}} \varepsilon_{\text{dihédre}}$$

$$\text{avec } \varepsilon_{\text{dihédre}} = k_{\text{dihédre}} (\phi - \phi_{\text{min}})^2 \text{ si } \phi < \phi_{\text{min}}$$

$$\varepsilon_{\text{dihédre}} = 0 \text{ si } \phi_{\text{min}} < \phi < \phi_{\text{max}}$$

$$\varepsilon_{\text{dihédre}} = k_{\text{dihédre}} (\phi - \phi_{\text{max}})^2 \text{ si } \phi > \phi_{\text{max}}$$

$k_{\text{dihédre}}$ est la constante de force, ϕ_{min} et ϕ_{max} sont les bornes de l'intervalle d'angle sur la contrainte sur les angles diédres ($\phi, \psi, \chi_1 \dots$).

3.2 Le recuit simulé et l'affinement

Pour explorer au mieux l'espace conformationnel, franchir les barrières d'énergies et éviter d'emprisonner la structure dans un minimum local d'énergie, nous appliquons la dynamique moléculaire à la procédure de recuit simulé. Dans cette procédure, toutes les contraintes sur les distances, les angles diédres sont utilisées. Les liaisons hydrogènes sont traduites en terme de contraintes de distance, et les ponts disulfures sont introduits en tant que liens covalents. La procédure de recuit simulé consiste à fournir au système de l'énergie en le plaçant à une température de 2000 K dans une première étape, puis de 1000 K dans une seconde étape moins drastique. Nous laissons ensuite évoluer le système à la recherche de la conformation la plus favorable, puis nous le refroidissons jusqu'à température ambiante pour atteindre un puits de potentiel énergétique. Ce refroidissement se fait par étape pendant laquelle sont calculées l'énergie potentielle, l'accélération et ainsi les nouvelles coordonnées des atomes. Après une procédure de minimisation finale, nous obtenons une famille de structures de plus basses énergies possibles qui satisfont les contraintes imposées sur les distances et sur les angles diédres.

Annexe III.2 Les 28 ponts disulfures potentiels

de la toxine d'araignée V50F17

Pont disulfure



Numéro du pont disulfure:	1	Cys3 - Cys10
	2	Cys3 - Cys18
	3	Cys3 - Cys19
	4	Cys3 - Cys23
	5	Cys3 - Cys25
	6	Cys3 - Cys42
	7	Cys3 - Cys44
	8	Cys10 - Cys18
	9	Cys10 - Cys19
	10	Cys10 - Cys23
	11	Cys10 - Cys25
	12	Cys10 - Cys42
	13	Cys10 - Cys44
	14	Cys18 - Cys19
	15	Cys18 - Cys23
	16	Cys18 - Cys25
	17	Cys18 - Cys42
	18	Cys18 - Cys44
	19	Cys19 - Cys23
	20	Cys19 - Cys25
	21	Cys19 - Cys42
	22	Cys19 - Cys44
	23	Cys23 - Cys25
	24	Cys23 - Cys42
	25	Cys23 - Cys44
	26	Cys25 - Cys42
	27	Cys25 - Cys44
	28	Cys42 - Cys44

Annexe III.3 Les 105 combinaisons potentielles de ponts disulfures de la toxine d'araignée V50F17

La combinaison de la protéine native est notée par une *

Numéro de la combinaison de ponts disulfures



- 1 Cys3 - Cys10, Cys18 - Cys19, Cys23 - Cys25, Cys42 - Cys44
- 2 Cys3 - Cys10, Cys18 - Cys19, Cys23 - Cys42, Cys25 - Cys44
- 3 Cys3 - Cys10, Cys18 - Cys19, Cys23 - Cys44, Cys25 - Cys42
- 4 Cys3 - Cys10, Cys18 - Cys23, Cys19 - Cys25, Cys42 - Cys44
- 5 Cys3 - Cys10, Cys18 - Cys23, Cys19 - Cys42, Cys25 - Cys44
- 6 Cys3 - Cys10, Cys18 - Cys23, Cys19 - Cys44, Cys25 - Cys42
- 7 Cys3 - Cys10, Cys18 - Cys25, Cys19 - Cys23, Cys42 - Cys44
- 8 Cys3 - Cys10, Cys18 - Cys25, Cys19 - Cys42, Cys23 - Cys44
- 9 Cys3 - Cys10, Cys18 - Cys25, Cys19 - Cys44, Cys23 - Cys42
- 10 Cys3 - Cys10, Cys18 - Cys42, Cys19 - Cys23, Cys25 - Cys44
- 11 Cys3 - Cys10, Cys18 - Cys42, Cys19 - Cys25, Cys23 - Cys44
- 12 Cys3 - Cys10, Cys18 - Cys42, Cys19 - Cys44, Cys23 - Cys25
- 13 Cys3 - Cys10, Cys18 - Cys44, Cys19 - Cys23, Cys25 - Cys42
- 14 Cys3 - Cys10, Cys18 - Cys44, Cys19 - Cys25, Cys23 - Cys42
- 15 Cys3 - Cys10, Cys18 - Cys44, Cys19 - Cys42, Cys23 - Cys25

- 16 Cys3 - Cys18, Cys10 - Cys19, Cys23 - Cys25, Cys42 - Cys44
- 17 Cys3 - Cys18, Cys10 - Cys19, Cys23 - Cys42, Cys23 - Cys44
- 18 Cys3 - Cys18, Cys10 - Cys19, Cys23 - Cys44, Cys25 - Cys42
- 19 Cys3 - Cys18, Cys10 - Cys23, Cys19 - Cys25, Cys42 - Cys44
- 20 Cys3 - Cys18, Cys10 - Cys23, Cys19 - Cys42, Cys25 - Cys44
- 21 Cys3 - Cys18, Cys10 - Cys23, Cys19 - Cys44, Cys25 - Cys42
- 22 Cys3 - Cys18, Cys10 - Cys25, Cys19 - Cys23, Cys42 - Cys44
- 23 Cys3 - Cys18, Cys10 - Cys25, Cys19 - Cys42, Cys23 - Cys44
- 24 Cys3 - Cys18, Cys10 - Cys25, Cys19 - Cys44, Cys23 - Cys42
- 25 Cys3 - Cys18, Cys10 - Cys42, Cys23 - Cys25, Cys19 - Cys44

- 26 Cys3 - Cys18, Cys10 - Cys42, Cys19 - Cys23, Cys25 - Cys44
27 Cys3 - Cys18, Cys10 - Cys42, Cys23 - Cys44, Cys19 - Cys25
28 Cys3 - Cys18, Cys10 - Cys44, Cys19 - Cys23, Cys25 - Cys42
29 Cys3 - Cys18, Cys10 - Cys44, Cys19 - Cys25, Cys23 - Cys42
30 Cys3 - Cys18, Cys10 - Cys44, Cys19 - Cys42, Cys23 - Cys25
- 31 Cys3 - Cys19, Cys10 - Cys18, Cys23 - Cys25, Cys42 - Cys44
32 Cys3 - Cys19, Cys10 - Cys18, Cys23 - Cys42, Cys25 - Cys44
33 Cys3 - Cys19, Cys10 - Cys18, Cys23 - Cys44, Cys25 - Cys42
34* Cys3 - Cys19, Cys10 - Cys23, Cys25 - Cys42, Cys18 - Cys44
35 Cys3 - Cys19, Cys10 - Cys23, Cys18 - Cys25, Cys42 - Cys44
36 Cys3 - Cys19, Cys10 - Cys23, Cys25 - Cys44, Cys18 - Cys42
37 Cys3 - Cys19, Cys10 - Cys25, Cys18 - Cys23, Cys42 - Cys44
38 Cys3 - Cys19, Cys10 - Cys25, Cys23 - Cys42, Cys18 - Cys44
39 Cys3 - Cys19, Cys10 - Cys25, Cys23 - Cys44, Cys18 - Cys42
40 Cys3 - Cys19, Cys10 - Cys42, Cys18 - Cys23, Cys25 - Cys44
41 Cys3 - Cys19, Cys10 - Cys42, Cys18 - Cys25, Cys23 - Cys44
42 Cys3 - Cys19, Cys10 - Cys42, Cys18 - Cys44, Cys23 - Cys25
43 Cys3 - Cys19, Cys10 - Cys44, Cys18 - Cys23, Cys25 - Cys42
44 Cys3 - Cys19, Cys10 - Cys44, Cys18 - Cys25, Cys23 - Cys42
45 Cys3 - Cys19, Cys10 - Cys44, Cys18 - Cys42, Cys23 - Cys25
- 46 Cys3 - Cys23, Cys18 - Cys19, Cys10 - Cys25, Cys42 - Cys44
47 Cys3 - Cys23, Cys18 - Cys19, Cys25 - Cys42, Cys10 - Cys44
48 Cys3 - Cys23, Cys18 - Cys19, Cys25 - Cys44, Cys10 - Cys42
49 Cys3 - Cys23, Cys18 - Cys25, Cys10 - Cys19, Cys42 - Cys44
50 Cys3 - Cys23, Cys18 - Cys25, Cys19 - Cys42, Cys10 - Cys44
51 Cys3 - Cys23, Cys18 - Cys25, Cys19 - Cys44, Cys10 - Cys42
52 Cys3 - Cys23, Cys10 - Cys18, Cys25 - Cys42, Cys19 - Cys44
53 Cys3 - Cys23, Cys10 - Cys18, Cys19 - Cys25, Cys42 - Cys44
54 Cys3 - Cys23, Cys10 - Cys18, Cys25 - Cys44, Cys19 - Cys42
55 Cys3 - Cys23, Cys18 - Cys42, Cys19 - Cys25, Cys10 - Cys44
56 Cys3 - Cys23, Cys18 - Cys42, Cys10 - Cys19, Cys25 - Cys44
57 Cys3 - Cys23, Cys18 - Cys42, Cys19 - Cys44, Cys10 - Cys25
58 Cys3 - Cys23, Cys18 - Cys44, Cys10 - Cys19, Cys25 - Cys42
59 Cys3 - Cys23, Cys18 - Cys44, Cys10 - Cys25, Cys19 - Cys42
60 Cys3 - Cys23, Cys18 - Cys44, Cys10 - Cys42, Cys19 - Cys25
- 61 Cys3 - Cys25, Cys10 - Cys18, Cys19 - Cys23, Cys42 - Cys44

- 62 Cys3 - Cys25, Cys10 - Cys18, Cys19 - Cys42, Cys23 - Cys44
63 Cys3 - Cys25, Cys10 - Cys18, Cys19 - Cys44, Cys23 - Cys42
64 Cys3 - Cys25, Cys10 - Cys19, Cys18 - Cys23, Cys42 - Cys44
65 Cys3 - Cys25, Cys10 - Cys19, Cys23 - Cys42, Cys18 - Cys44
66 Cys3 - Cys25, Cys10 - Cys19, Cys23 - Cys44, Cys18 - Cys42
67 Cys3 - Cys25, Cys10 - Cys23, Cys18 - Cys19, Cys42 - Cys44
68 Cys3 - Cys25, Cys10 - Cys23, Cys18 - Cys42, Cys19 - Cys44
69 Cys3 - Cys25, Cys10 - Cys23, Cys18 - Cys44, Cys19 - Cys42
70 Cys3 - Cys25, Cys10 - Cys42, Cys18 - Cys19, Cys23 - Cys44
71 Cys3 - Cys25, Cys10 - Cys42, Cys18 - Cys23, Cys19 - Cys44
72 Cys3 - Cys25, Cys10 - Cys42, Cys18 - Cys44, Cys19 - Cys23
73 Cys3 - Cys25, Cys10 - Cys44, Cys18 - Cys19, Cys23 - Cys42
74 Cys3 - Cys25, Cys10 - Cys44, Cys18 - Cys23, Cys19 - Cys42
75 Cys3 - Cys25, Cys10 - Cys44, Cys18 - Cys42, Cys19 - Cys23
- 76 Cys3 - Cys42, Cys10 - Cys18, Cys19 - Cys23, Cys25 - Cys44
77 Cys3 - Cys42, Cys10 - Cys18, Cys19 - Cys25, Cys23 - Cys44
78 Cys3 - Cys42, Cys10 - Cys18, Cys19 - Cys44, Cys23 - Cys25
79 Cys3 - Cys42, Cys10 - Cys23, Cys18 - Cys19, Cys25 - Cys44
80 Cys3 - Cys42, Cys10 - Cys23, Cys18 - Cys25, Cys19 - Cys44
81 Cys3 - Cys42, Cys10 - Cys23, Cys18 - Cys44, Cys19 - Cys25
82 Cys3 - Cys42, Cys10 - Cys19, Cys18 - Cys23, Cys25 - Cys44
83 Cys3 - Cys42, Cys10 - Cys19, Cys18 - Cys25, Cys23 - Cys44
84 Cys3 - Cys42, Cys10 - Cys19, Cys18 - Cys44, Cys23 - Cys25
85 Cys3 - Cys42, Cys10 - Cys25, Cys18 - Cys19, Cys23 - Cys44
86 Cys3 - Cys42, Cys10 - Cys25, Cys18 - Cys23, Cys19 - Cys44
87 Cys3 - Cys42, Cys10 - Cys25, Cys18 - Cys44, Cys19 - Cys23
88 Cys3 - Cys42, Cys10 - Cys44, Cys18 - Cys19, Cys23 - Cys25
89 Cys3 - Cys42, Cys10 - Cys44, Cys18 - Cys23, Cys19 - Cys25
90 Cys3 - Cys42, Cys10 - Cys44, Cys18 - Cys25, Cys19 - Cys23
- 91 Cys3 - Cys44, Cys10 - Cys18, Cys19 - Cys23, Cys25 - Cys42
92 Cys3 - Cys44, Cys10 - Cys18, Cys19 - Cys25, Cys23 - Cys42
93 Cys3 - Cys44, Cys10 - Cys18, Cys19 - Cys42, Cys23 - Cys25
94 Cys3 - Cys44, Cys10 - Cys19, Cys23 - Cys25, Cys18 - Cys42
95 Cys3 - Cys44, Cys10 - Cys19, Cys18 - Cys23, Cys25 - Cys42
96 Cys3 - Cys44, Cys10 - Cys19, Cys23 - Cys42, Cys18 - Cys25
97 Cys3 - Cys44, Cys10 - Cys23, Cys18 - Cys19, Cys25 - Cys42
98 Cys3 - Cys44, Cys10 - Cys23, Cys18 - Cys25, Cys19 - Cys42

- 99 Cys3 - Cys44, Cys10 - Cys23, Cys18 - Cys42, Cys19 - Cys25
- 100 Cys3 - Cys44, Cys10 - Cys25, Cys18 - Cys19, Cys23 - Cys42
- 101 Cys3 - Cys44, Cys10 - Cys25, Cys18 - Cys23, Cys19 - Cys42
- 102 Cys3 - Cys44, Cys10 - Cys25, Cys18 - Cys42, Cys19 - Cys23
- 103 Cys3 - Cys44, Cys10 - Cys42, Cys18 - Cys19, Cys23 - Cys25
- 104 Cys3 - Cys44, Cys10 - Cys42, Cys18 - Cys23, Cys19 - Cys25
- 105 Cys3 - Cys44, Cys10 - Cys42, Cys18 - Cys25, Cys19 - Cys23

Conclusion générale

Conclusion générale

Nous avons abordé dans ce travail trois approches de la Résonance Magnétique Nucléaire. La première a été une approche chimique où nous avons appliqué la technique RMN à l'angle magique pour la synthèse organique et peptidique, en phase solide. Dans une seconde approche, nous nous sommes intéressés aux aspects méthodologiques de la RMN liquide haute résolution, où nous avons cherché à améliorer les séquences homonucléaires NOESY et TOCSY. Finalement, dans une troisième approche, nous avons avantageusement utilisé ces séquences NOESY et TOCSY modifiées pour la détermination de la structure tridimensionnelle en solution d'une toxine de venin d'araignée V50F17.

(i) Durant le suivi complet de la synthèse organique en phase solide contenant la réaction de Heck, pour chacune des trois étapes de la synthèse, l'attribution de chaque nouvelle entité moléculaire formée sur la résine a été obtenue en ^1H et ^{13}C , sans avoir recours à la technique de coupure de la molécule de son support de synthèse. Ceci nous a permis de conclure quant au succès de la synthèse. La technique RMN MAS est une méthode analytique sensible, rapide et non-destructrice qui promet d'être très utile pour identifier des molécules produites par la synthèse organique en phase solide. Durant le suivi de la synthèse peptidique de la séquence dite "séquence difficile", nous avons montré que le peptide adoptait une structure de type étendu sur la résine, favorisant le phénomène d'agrégation par la formation de liaisons hydrogènes inter-chaines. L'utilisation d'un mélange aprotique polaire DMF/DMSO pour gonfler la résine a permis de supprimer le phénomène d'agrégation et d'obtenir des spectres parfaitement résolus. La technique RMN MAS est une technique analytique adaptée à la détermination des meilleures conditions de synthèse (solvatation de la peptidyl-résine) permettant d'améliorer les rendements de couplage, et à l'étude structurale de peptides sur support solide. Les questions auxquelles nous avons pu répondre et celles que nous avons soulevées nous ont permis d'envisager de nouvelles perspectives où la RMN MAS va constituer un outil essentiel d'analyse. Toutes les potentialités de cette technique vont être employées pour résoudre des problèmes purs de synthèse, mais également pour faciliter l'étude de peptides qui s'agrègent en solution, comme les peptides isolés de la protéine du prion.

(ii) Par l'incorporation d'impulsions sélectives *water flip-back* dans les expériences homonucléaires NOESY et TOCSY, nous avons obtenu un état non saturé de l'aimantation de l'eau le long de l'axe (+z) au début de la période d'acquisition, indépendamment de la phase et des incréments t_1 . Pour ces deux expériences, nous avons obtenu une excellente suppression du signal de l'eau. La minimisation de la saturation de l'eau a permis d'obtenir un gain en intensité de 20 % sur l'ensemble des résonances durant l'expérience NOESY. Pour l'expérience TOCSY, un gain en intensité a surtout été observé pour les protons amide des résidus exposés au solvant. La facilité à manipuler les impulsions *water flip-back* rend ces deux séquences aisément incorporables dans des séquences hétéronucléaires telles que les séquences HSQC-TOCSY et HSQC-NOESY.

(iii) La structure tridimensionnelle de la toxine d'araignée V50F17, que nous avons déterminée par RMN, présente une conformation originale. En effet, en plus du feuillet de trois brins β antiparallèles riches en résidus cystéine, qui constitue le motif structural commun aux toxines de venin d'araignée et de serpent de mer, un petit domaine en hélice α appartenant à la boucle reliant les brins β_3 et β_4 du feuillet a été identifié. Cette hélice α à caractère très hydrophobe est le premier élément de structure secondaire identifié dans cette boucle chez les toxines d'araignée et de serpent de mer. La structure tridimensionnelle d'un membre de cette nouvelle famille de toxine V50 pourrait nous permettre de mieux comprendre le mécanisme d'interaction de la toxine avec son canal calcique, et ainsi d'établir un lien entre la structure et la spécificité de la toxine pour ce canal.

