

caractérisation moléculaire par RMN : vers l'emploi de sondes extrinsèques

Gaspard Huber

▶ **To cite this version:**

Gaspard Huber. caractérisation moléculaire par RMN : vers l'emploi de sondes extrinsèques. Biophysique [physics.bio-ph]. Université Paris Sud - Paris XI, 2006. tel-00173563

HAL Id: tel-00173563
https://theses.hal.science/tel-00173563

Submitted on 20 Sep 2007

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

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

Université Paris XI – Orsay

Habilitation à Diriger les Recherches

Spécialité : Chimie-Physique

caractérisation moléculaire par RMN : vers l'emploi de sondes extrinsèques

Gaspard HUBER

Soutenue le 15 décembre 2006, devant le jury composé de :

- Pr. Frédéric DARDEL (*Président*)
- Pr. Jacques COURTIEU (*Rapporteur*)
- Pr. Lyndon EMSLEY (*Rapporteur*)
- Pr. Claudio LUCHINAT (*Rapporteur*)

Laboratoire de Structure et Dynamique par Résonance Magnétique
Service de Chimie Moléculaire,
URA 331, CEA/CNRS
DRECAM
C.E.A. Saclay
91191 Gif sur Yvette cedex
Tel : 01 69 08 64 82
Mail : gaspard.huber@cea.fr

Table des matières

Introduction ____ *4*

I. Caractérisation de biomolécules par RMN ____ *5*

I-A. Métabolisme cellulaire ____ **5**
I-A-1. Blocage du métabolisme cellulaire et analyse par RMN HRMAS ____ 5
I-A-2. Analyse en continu du métabolisme cellulaire ____ 7

I-B. Saccharides cycliques partiellement méthylés ____ **8**

I-C. Protéines ____ **9**
I-C-1. RMN des protéines paramagnétiques ____ 9
I-C-2. Attribution de protéines ____ 11
I-C-3. Contraintes structurales de protéines paramagnétiques ____ 11
I-C-4. Structure en solution d'une protéine diamagnétique ____ 14

I-D. Localisation de molécules d'eau au sein d'une protéine ____ **15**

I-E. Mesure des vitesses d'échange électronique ____ **17**

II. Le xénon : sonde exogène de cavités hydrophobes ____ *20*

II-A. Propriétés du xénon ____ **20**

II-B. Hyperpolarisation du xénon ____ **21**
II-B-1. Aspects expérimentaux de l'utilisation du xénon polarisé ____ 22

II-C. Séquences spécifiques au xénon polarisé ____ **23**

II-D. Caractérisation de cavités hydrophobes de protéines ____ **27**
II-D-1. Propriétés intrinsèques du xénon ____ 27
II-D-2. Propriétés RMN de la protéine ____ 30
II-D-3. Propriétés impliquant le xénon et la protéine : interactions dipolaires croisées observées par SPINOE 33

II-E. Complexation du xénon par des cryptophanes ____ **36**
II-E-1. Structure et dynamique des cryptophanes complexés en solution ____ 38
II-E-2. Cinétique de la complexation du xénon ____ 45
II-E-3. Thermodynamique de la complexation xénon-cryptophanes ____ 46

III. Conclusion-Perspectives ____ *49*

IV. Curriculum vitæ ____ *53*

Remerciements

La recherche scientifique est de nos jours un travail d'équipe, et il serait inconcevable de ne pas exprimer ici mes remerciements envers les personnes ayant participé aux recherches mentionnées dans ce mémoire.

Ainsi, j'aimerais souligner les qualités humaines et scientifiques, ainsi que le sens de l'encadrement, des Docteurs Jacques GAILLARD et Jean-Marc MOULIS. Au cours de mes séjours post-doctoraux, les continuels échanges, avec les professeurs Ivano BERTINI et Claudio LUCHINAT et les docteurs Françoise GUERLESQUIN et Mario PICCIOLI, m'ont considérablement enrichi sur le plan personnel. Découvrir de nouveaux laboratoires, dans des régions et pays variés a été pour moi une source d'enrichissement immense sur les plans scientifique et personnel.

Je tiens à remercier Patrick BERTHAULT et Hervé DESVAUX qui m'ont accueilli dans leur laboratoire et me font partager une approche originale de la RMN, qui m'était alors totalement inconnue, et qui consiste en l'exploitation des propriétés particulière des gaz polarisés pour la description de systèmes liquides et solides, simples ou complexes. Cette approche s'est avérée passionnante, pleine d'avenir, en particulier grâce au dynamisme et à la compétence scientifique de mes collègues. J'aimerais enfin remercier les nombreuses personnes que j'ai côtoyées et appréciées au cours de mon cursus et dont je n'oserais faire une liste exhaustive de peur d'en oublier.

Je n'oublierai pas non plus ma famille, et en particulier ma femme Laurence, qui m'ont soutenu et encouragé au cours de ces années.

Introduction

Un parcours scientifique, tant avec le statut d'étudiant que de chercheur statutaire, est toujours question de compromis entre choix personnels et opportunités. Pour ma part, j'ai eu la chance de travailler dans des laboratoires fort différents quant aux thématiques abordées, mais dont l'outil principal était la Résonance Magnétique Nucléaire, et dont l'objectif général était la caractérisation de la matière. J'ai donc pu saisir des opportunités en accord avec mes goûts pour les méthodes d'analyse à l'échelle moléculaire. Mon intérêt pour ce vaste domaine n'a fait qu'augmenter à mesure que je découvrais la richesse de la RMN et l'étendue de ces applications. Je propose dans ce mémoire de présenter les divers axes de recherche dans lesquels je me suis impliqué, en précisant qu'il s'agit toujours d'un travail d'équipe, tant en ce qui concerne la problématique de la recherche que sa réalisation. J'espère que j'aurai participé à faire progresser la connaissance des systèmes abordés. Je souhaite également que la diversité des expériences et compétences que j'ai acquises me permettront d'améliorer encore la description, non seulement structurale, mais aussi et surtout dynamique, de systèmes complexes en solution.

La caractérisation moléculaire, principalement en phase liquide, est une notion vaste qu'il convient à présent de préciser. Il peut s'agir simplement de différencier deux lots par une propriété RMN quelconque, par exemple dans le cadre d'un contrôle qualité, ou pour mettre en évidence des conditions de culture aérobique ou anaérobique (partie II-A-1). Plus généralement, il peut s'agir d'établir la composition d'un mélange de produits, même si, dans ce cas, des étapes supplémentaires de préparation d'échantillon peuvent être utiles. Dans le cas de cinétiques lentes, à l'échelle de dizaines de secondes ou plus, des informations sur la vitesse et la nature de la modification peuvent être extraites. Ainsi, j'aborderai la question de la mesure en continu d'un profil métabolique (II-A-2).

A une échelle infra-moléculaire, l'objectif peut être d'établir la formule développée d'une molécule (II-B), voire la composition isotopique de la molécule entière ou d'un fragment. Si la formule développée est connue, comme par exemple l'enchaînement des acides aminés d'une protéine, qui constitue sa structure primaire, un grand intérêt de la RMN est de pouvoir préciser des éléments de structure locale (éléments de structure secondaire pour une protéine), voire la structure tridimensionnelle complète de la molécule (II-C).

Mais la structure d'une molécule en solution n'est pas figée. Elle se déforme, à des échelles de temps très variées, de la femtoseconde à des mois, voire des années, autour d'une ou plusieurs structures moyennes. Par l'espace conformationnel exploré, cette flexibilité est d'ailleurs bien souvent à l'origine de la structuration des molécules, mais aussi de leur réactivité chimique ou de leur fonction biologique. La mobilité du solvant avec lequel interagissent les molécules, tient une place fondamentale dans la caractérisation de la dynamique moléculaire (II-D). Mais la dynamique observée n'est pas nécessairement liée à des déplacements d'atomes. Ainsi, dans le cas de centres métalliques à différents degrés d'oxydation, des échanges électroniques peuvent également être décrits (II-E).

Pour compléter la gamme de caractérisation d'un système, il est intéressant d'utiliser des sondes exogènes capables de fournir des renseignements sur le système, en le perturbant peu ou de manière contrôlée. Le xénon représente sans doute une des sondes les plus intéressantes. Parmi ses propriétés remarquables (III-A), la plus importante du point de vue de la RMN est certainement la possibilité d'augmenter sa polarisation nucléaire, et donc la sensibilité de la technique, de plusieurs ordres de grandeur (III-B). Le xénon sert par exemple à caractériser des cavités hydrophobes de protéines (III-C), cavités dont il est souvent difficile par ailleurs d'obtenir des informations, en particulier d'ordre dynamique. Le xénon, gaz rare hydrophobe, est par ailleurs assez fortement complexé par des molécules cages appelés cryptophanes. L'étude de cette complexation (III-D) représente une première étape vers l'élaboration de systèmes moléculaires capables de complexer spécifiquement des cibles

chimiques ou biologiques données, ouvrant de riches perspectives dans le domaine de l'imagerie de déplacement chimique ou encore dans la détection de traces moléculaires au sein d'un mélange.

I. Caractérisation de biomolécules par RMN

I-A. Métabolisme cellulaire

I-A-1. Blocage du métabolisme cellulaire et analyse par RMN HRMAS

Parmi les différents modes de caractérisation d'un échantillon, l'un des plus simples, du moins conceptuellement, est de déterminer sa composition chimique. Cet objectif est souvent irréalisable au moyen de la RMN seule, puisque celle-ci n'apporte en général que des informations de l'environnement immédiat (quelques liaisons chimiques, quelques Å) de chaque noyau utilisé comme sonde, pour chaque molécule. Il sera alors très difficile de déterminer avec certitude la formule développée d'une molécule, si l'on ne dispose pas d'autres informations à son sujet. Dans le cas d'un mélange de produits, la tâche s'avère généralement insurmontable.

Cependant, la RMN est une méthode quantitative : tous les noyaux du même isotope sont observables en proportion de leur concentration, pour peu que l'on attende longtemps devant le temps de relaxation longitudinale T_1 de ces noyaux. La largeur des signaux est quant-à-elle inversement proportionnelle au temps de relaxation transversale T_2 des noyaux correspondants. Elle peut rendre inobservable les signaux de trop gros objets ou de molécules fortement paramagnétiques. Dans le cas de l'analyse de cellules entières, et en RMN du proton et du carbone 13 par exemple, on observe ainsi essentiellement des métabolites cellulaires, molécules diamagnétiques, de petite taille, et parmi elles davantage celles présentes en forte concentration.

L'intérêt de la RMN peut alors résider davantage dans le grand nombre d'informations observables, même sur les spectres les plus simples (figure 1). Ainsi, 2 échantillons cellulaires, de lignée, de conditions de culture différentes ou soumis à des stress distincts deviennent différentiables au moyen de spectres enregistrés dans les mêmes conditions, et analysés au moyen de tests statistiques.

Dans le cas de cultures cellulaires, la faible concentration des métabolites oblige à augmenter le nombre d'acquisition du spectre RMN pour améliorer le rapport signal sur bruit. Les longues durées qui en résultent impliquent fatalement une évolution de l'état métabolique des cellules et donc une perte de précision de la mesure et de la faculté à distinguer des échantillons. C'est pourquoi a été développée une méthode visant à analyser pendant une longue durée l'état métabolique de cellules à un instant donné. Cette méthode a fait l'objet d'une demande de brevet [**1**].

La première étape de la procédure consiste à bloquer le métabolisme en refroidissant brutalement les cellules, en les plaçant, dans l'exemple de la figure 1, dans un mélange eau:méthanol 50:50 à basse température, environ –40°C. Dans un deuxième temps, les cellules sont lyophilisées, puis replacées dans un solvant, de préférence deutéré, de manière que l'échantillon reste liquide aux plus basses températures compatibles avec l'analyse par RMN.

L'exemple de la figure 1 illustre la méthode dans le cas de cellules cultivées dans des conditions aérobies strictes, puis passées brusquement en conditions anaérobiques. Sans même nécessiter l'attribution des spectres, la RMN offre ainsi un très grand nombre de paramètres qui sont autant de tests statistiques potentiels pour distinguer des échantillons. La caractérisation métabonomomique, par RMN mais aussi par d'autres approches comme la spectrométrie de masse, fait l'objet d'une intense recherche tant sur au niveau expérimental qu'au niveau de l'analyse des résultats [**2**].

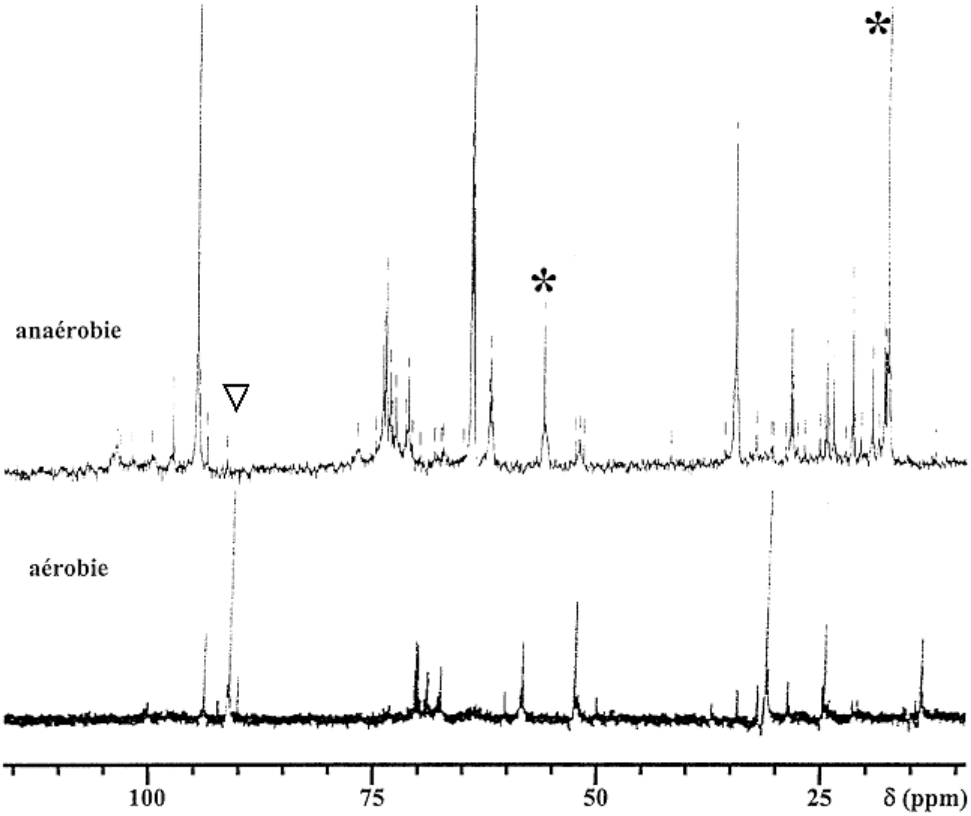


Figure 1 – Spectres ^{13}C de cellules de levure en condition aérobie stricte (en bas) et après 25' de condition anaérobie [1]. Les échantillons sont prélevés et immédiatement placés dans une solution équimolaire eau:méthanol. Ils sont ensuite lyophilisés, rincés avec une solution de PBS (Phosphate Buffer Saline), à nouveau lyophilisés et stockés à –80°C. Ils sont finalement dissous dans une solution équimolaire D_2O:CD_3OD, conservés en dessous de 0°C. Les spectres 13C réalisés sur un spectromètre Bruker 500 MHz équipé d'une sonde HRMAS sont enregistrés à –10°C. Les signaux marqués d'un astérisque (*), qui correspondent à l'éthanol, apparaissent dans les conditions anaérobie (fermentation, consommatrice d'énergie), tandis qu'un des signaux caractéristiques du tréhalose (▽), source d'énergie des cellules, apparaît.

I-A-2. Analyse en continu du métabolisme cellulaire

Une autre approche consiste à caractériser continûment dans le temps cet état métabolique. Le dispositif, qui a fait aussi l'objet d'une demande de brevet [**3**], consiste en un système fermé comprenant un réacteur cellulaire (**1** sur la figure 2A), au niveau duquel il est possible de faire varier les conditions de culture cellulaire, un conduit **2** permettant d'envoyer rapidement une partie du milieu de culture vers la sonde de mesure par RMN, au moyen d'une pompe péristaltique **3** et un conduit de retour vers le milieu de culture. Le conduit d'arrivée est branché sur un tuyau en verre **4**, enroulé dans un portoir de tube RMN modifié **5** (figure 2B). L'enroulement permet d'augmenter le temps de présence des spins nucléaires à l'endroit où le champ magnétique est très élevé, et donc de les polariser au mieux avant l'acquisition du spectre au niveau de la bobine de détection **6** de la sonde **7**. Ce système permet l'enregistrement en continu de spectres RMN. L'inconvénient inhérent à ce système, comme aux autres systèmes d'analyse en continu comme la chromatographie en phase liquide couplée à la RMN, est la faible sensibilité de la RMN entraînant un faible rapport signal sur bruit. Cependant, comme un grand volume d'échantillon, devant le volume de la bobine de détection, est polarisé, il est possible d'augmenter la vitesse d'acquisition des spectres. Dans une seconde phase post-expérimentale, on peut sommer plusieurs spectres consécutifs pour améliorer le rapport signal sur bruit, au détriment de la résolution temporelle des spectres. Une acquisition simultanée de spectres ^{1}H et ^{13}C est aussi envisageable, ou encore des spectres multidimensionnels d'acquisition rapide (par exemple [**4**]), pour gagner encore en information.

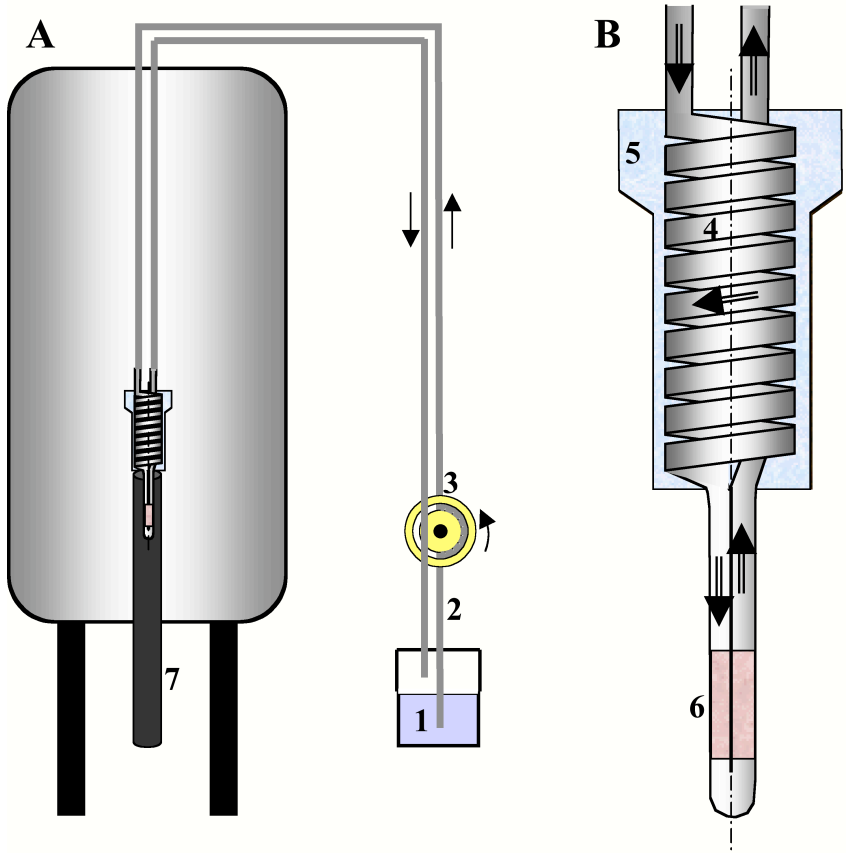


Figure 2 – Schéma du montage d'analyse en continu du métabolisme cellulaire (A) et agrandissement de la partie placée sous fort champ magnétique (B). Les numéros sont expliqués dans le texte.

I-B. Saccharides cycliques partiellement méthylés

Outre l'analyse de spectres de mélanges complexes comme les milieux intracellulaires, la RMN est une technique analytique performante en vue de la détermination de la formule développée de molécules. Cependant, elle nécessite le plus souvent des informations complémentaires, comme une idée préconçue du type de molécules présentes.

En marge de l'application aux protéines, dans laquelle je me suis beaucoup investi et qui fait l'objet du prochain paragraphe, j'ai participé à la caractérisation de deux oligosaccharides cycliques. La particularité de ce domaine tient au fait que les déplacements chimiques des protons, et dans une moindre mesure des carbones 13, occupent une gamme très limitée, non seulement pour des positions équivalentes sur chacune des différentes unités D-glucopyranose, mais aussi pour les protons d'un même cycle, à l'exception des protons anomériques, qui résonnent à champ plus faible. Ceci rend délicate la tâche d'attribution des signaux. Cette étude avait pour moi un double objectif : m'initier à la caractérisation d'une classe importante de biomolécules que sont les sucres, et découvrir des séquences RMN particulièrement adaptées aux cas où la résolution spectrale est limitée.

Il s'agissait de caractériser les produits de synthèse de la déméthylation partielle de la β-cyclodextrine perméthylée (figure 3). Cette déméthylation est spécifique du fait de l'utilisation d'un hydrure particulier, le DIBAL. Après 3 heures de réaction, un tétrol est obtenu majoritairement [**5**], et après 28 heures, le produit majoritaire est un hexol [**6**] (figure 3). L'enregistrement de spectres RMN homonucléaires (proton) de type COSY, COSY relayé une ou plusieurs fois, NOESY, et hétéronucléaires (^{1}H-^{13}C) HSQC et HMBC ont été suffisants, en maximisant la résolution au moyen de repliements fréquentiels dans la dimension indirecte, pour s'assurer de la position des fonctions alcools dans le tétrol et l'hexol.

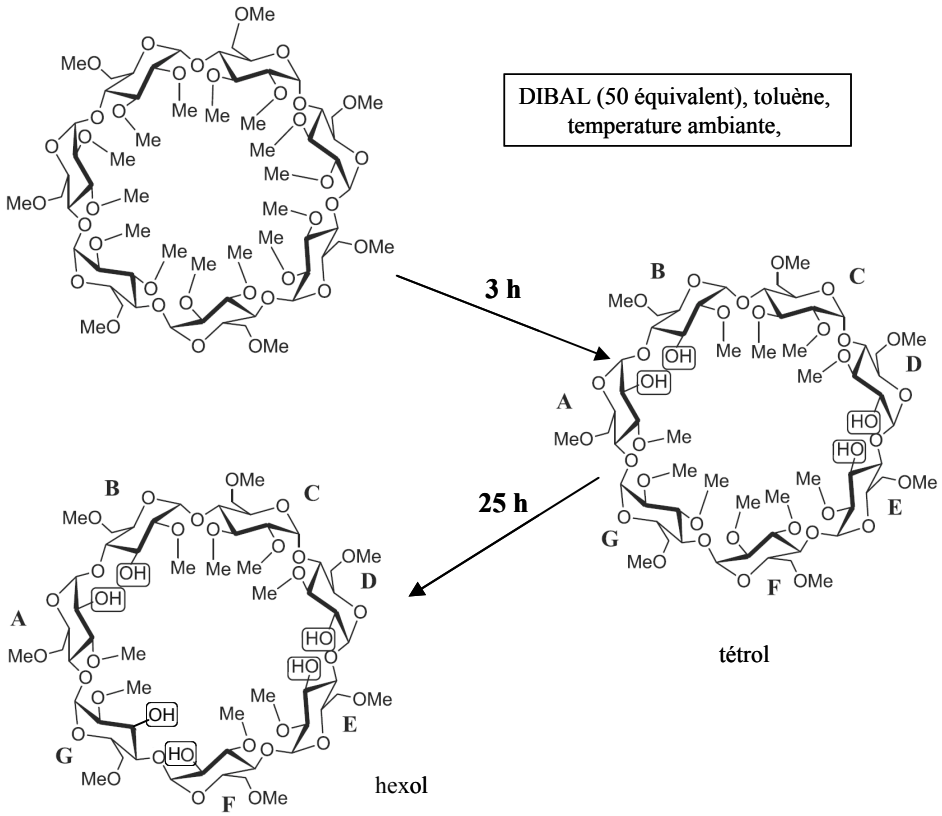


Figure 3 – Structure de la β-cyclodextrine perméthylée et des deux produits de synthèse caractérisés. DIBAL = hydrure de diisobutylaluminium

I-C. Protéines

I-C-1. RMN des protéines paramagnétiques

Je voudrais introduire ici les aspects originaux de la RMN appliquée aux molécules paramagnétiques, c'est-à-dire qui possèdent des centres paramagnétiques. Alors que les orbitales de molécules diamagnétiques comportent systématiquement deux électrons de spin opposé, et qui par conséquent annulent mutuellement leurs effets paramagnétiques, certaines orbitales de molécules paramagnétiques ne sont peuplées que d'un électron. Il en résulte en chaque point de l'espace une densité de spin électronique, c'est-à-dire une fraction d'électron célibataire par unité de volume, communément appelée densité de spin. Le lieu de plus forte densité de spin définit le centre paramagnétique. Le moment magnétique électronique étant beaucoup plus élevé que celui des spins nucléaires (658 fois celui du proton), la densité de spin induit d'importants effets sur les spins nucléaires.

Tout d'abord, des mécanismes de relaxation affectent les spins nucléaires. Il s'agit par exemple de l'interaction dipolaire spin électronique – spin nucléaire. L'expression bien connue de la relaxation dipolaire longitudinale T_1 d'un spin I interagissant avec un spin S, où I est ici un spin nucléaire et S un spin électronique, est (équation de Solomon [**7**]) :

$$T_{1dip}^{-1} = \frac{1}{10}\left(\frac{\mu_0 \hbar}{4\pi}\right)^2 \frac{\gamma_I^2 \gamma_S^2}{r^6}\left[\frac{\tau_C}{1+(\omega_H-\omega_S)^2\tau_C^2} + \frac{3\tau_C}{1+\omega_H^2\tau_C^2} + \frac{6\tau_C}{1+(\omega_H+\omega_S)^2\tau_C^2}\right] \qquad \textbf{(1)}$$

L'inverse du temps de corrélation τ_c est la somme de deux termes : celui rendant compte de la vitesse caractéristique de réorientation τ_r^{-1} du vecteur liant le spin électronique au spin nucléaire dans le champ magnétique, et celui lié à la vitesse de relaxation électronique τ_s^{-1}. τ_r^{-1} est de l'ordre de $2{,}5.10^8$ s^{-1} pour une protéine de 10 kDa dans l'eau à 20°C. Si τ_s^{-1} est prépondérant, la relaxation dipolaire croisée sera suffisamment limitée pour permettre l'observation du signal RMN. Lorsque τ_r^{-1} l'emporte, le signal peut être irrémédiablement perdu. Le spin électronique entraîne une relaxation du spin nucléaire par d'autres mécanismes que je ne détaillerai pas ici [**8**]. De plus, la relaxation croisée dipolaire entre deux noyaux, à l'origine des séquences de type NOESY et qui permettent d'estimer la distance entre deux noyaux et donc de remonter à la structure tridimensionnelle de la protéine, est concurrencée par la relaxation spin nucléaire-spin électronique. Les corrélations observées sont donc de moindre rapport signal sur bruit et parfois restent invisibles. Cependant, la diminution du T_1 des spins nucléaires permet d'augmenter le taux d'acquisition des spectres RMN, et donc le rapport signal sur bruit pour une durée fixée d'acquisition de spectres. Ainsi, au regard de spectres de protéines diamagnétiques, la perte de sensibilité due au paramagnétisme sera-t-elle au moins partiellement compensée.

D'autre part, le paramagnétisme peut induire des variations importantes de fréquence de résonance des spins nucléaires, particulièrement pour les noyaux les plus proches des centres paramagnétiques. Ceux-ci résonnent alors à l'extérieur de la gamme classique des protons diamagnétiques, comprise généralement entre –1 et 10 ppm. Ceci constitue souvent un avantage appréciable car chacun de ces signaux, lorsqu'il est bien isolé, devient une sonde facilement accessible, point de départ de toutes sortes d'expériences RMN.

Mes recherches ont porté sur 2 familles de protéines paramagnétiques. Les cytochromes c sont des protéines à un ou plusieurs hèmes reliés à la chaîne protéique par une ou deux cystéines. Les hèmes contiennent chacun un fer, ferrique (Fe^{3+}) bas spin dans la forme oxydée, paramagnétique. Son spin électronique vaut alors ½. L'ion ferreux (Fe^{2+}) de la forme réduite est de spin nul, la protéine est alors diamagnétique. Les cytochromes b5 sont reliés o la chaîne protéique par des histidines.

Je me suis aussi intéressé aux protéines à un ou deux centres polymétalliques, chacun constitué de 4 ions ferriques ou ferreux et de 4 ions sulfure. Au sein de ces centres [4Fe-4S], appelé aussi clusters, les ions ferriques et ferreux sont haut spin, et le spin électronique résultant vaut respectivement 5/2 et 2. Cependant, les ions se couplent magnétiquement entre eux, selon 2 modes souvent antagonistes. D'une part, le couplage de super-échange favorise deux ions à se coupler anti-ferromagnétiquement, en

conformité avec le principe de Pauli, c'est-à-dire que le sens de leur spin électronique est opposé. D'autre part, dans le cas d'une paire formée d'un ion ferreux et d'un ion ferrique, l'électron supplémentaire peut être délocalisé, impliquant alors un couplage ferromagnétique des 2 ions. Ce dernier terme appelé couplage de double échange, est prépondérant. Un ion ferreux et un ion ferrique forment alors une paire de deux ions $Fe^{2,5+}$ indiscernables. Il résulte du couplage entre les 4 ions de fer un ensemble de niveaux énergétiques, dont plusieurs sont significativement peuplés à température ambiante. Ainsi, si l'état fondamental d'un centre $[4Fe\text{-}4S]^{2+}$, qui contient formellement 2 ions Fe^{2+} et 2 ions Fe^{3+}, est diamagnétique, des états excités de spin 1 sont peuplés à environ 17 % à température ambiante. Cet état correspond à l'état réduit des ferrédoxines à haut potentiel, également appelées HiPIP, pour "High Potential Iron-sulphur Proteins", et à l'état oxydé des ferrédoxines proprement dites, à bas potentiel. Les centres métalliques réduits des ferrédoxines, $[4Fe\text{-}4S]^{+}$, comportent 3 ions Fe^{2+} et 1 ion Fe^{3+} et sont paramagnétiques de spin ½ à l'état fondamental, tout comme les centres oxydés des HiPIP, $[4Fe\text{-}4S]^{3+}$, qui comportent 1 ion Fe^{2+} et 3 ions Fe^{3+} (Figure 4). Dans ce dernier état, les fers se répartissent dans une paire à valence mixte ($Fe^{2,5+}$) et une paire d'ion ferrique (Fe^{3+}), et on a observé que la paire à valence mixte pouvait avoir deux positions avec un fer en commun, si bien que les charges formelles des 4 fers sont 3+, 2,75+, 2,75+ et 2,5+ [**9**]. Tous ces centres sont en général liés à la chaîne protéique par quatre atomes de soufre de cystéines.

Enfin, un grand nombre de ferrédoxines comportent 2 centres [4Fe-4S] distants de 9 Å environ, comme dans la ferrédoxine de *Chromatium vinosum* (Cv Fd), celle de *Clostridium pasteurianum* (Cp Fd), ou celle de *Clostridium acidurici* (Ca Fd).

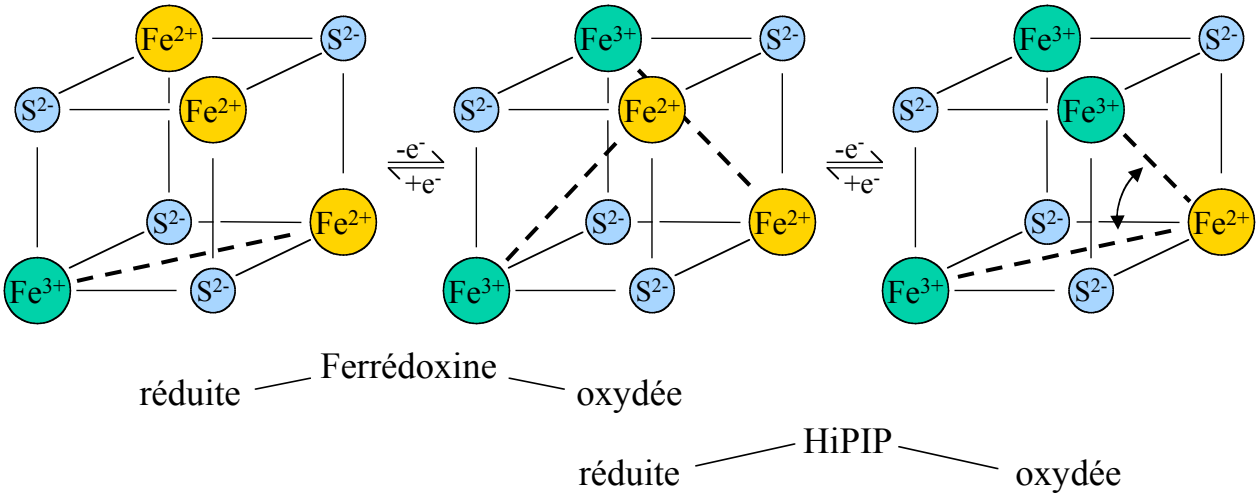


Figure 4 – Les différents états redox des centres [4Fe-4S] de ferrédoxines et HiPIP. Les charges des ions sont formelles. En pointillé sont représentées les paires à valence mixte.

I-C-2. Attribution de protéines

La quasi-totalité des études RMN visant à caractériser le contenu d'un échantillon à une échelle sub-moléculaire requiert l'attribution préalable au moins partielle des signaux, c'est-à-dire nécessite de relier les signaux aux noyaux de la molécule par le biais de leurs déplacements chimiques. Ceux-ci servent alors de sondes tant pour l'établissement de la structure de la protéine en solution, que pour mesurer sa dynamique interne, ou encore pour caractériser une interaction avec une ou plusieurs autres molécules présentes.

Dans le cas des protéines diamagnétiques structurées comportant moins d'une centaine d'acides aminés, cette étape préliminaire ne pose généralement pas de difficultés et aboutit à une attribution presque complète des signaux protons, à l'exception des protons rapidement échangeables. La méthodologie, initialement décrite par K. Wüthrich [**10**] est toujours employée. Pour des protéines de plus grande taille, l'attribution *via* les ^{13}C et ^{15}N se révèle souvent indispensable. Elle est réalisée au moyen de séquences 2D et 3D hétéronucléaires.

J'ai été amené à attribuer les signaux protons de deux protéines diamagnétiques de petite taille. La première, DsrD ("Dissimilatory sulfite reductase", sous-unité D), est une protéine exprimée par une protéine sulfato-réductrice. Bien que sa fonction exacte ne soit pas connue, il semble qu'elle joue un rôle essentiel dans la survie de la cellule. C'est pourquoi je me suis consacré, pendant mon court séjour post-doctoral dans le laboratoire de Françoise GUERLESQUIN, à l'attribution homonucléaire de cette protéine diamagnétique de 78 acides aminés.

J'ai également largement contribué à l'attribution proton de la forme réduite, diamagnétique, du cytochrome c de cœur de cheval [**11**]. Le cytochrome c est une protéine de 105 acides aminés qui possède un hème complexant un ion ferreux ou ferrique. Il intervient dans la chaîne transporteuse d'électrons permettant la réduction de l'oxygène moléculaire en eau. Malgré la taille plus importante de la protéine, l'anisotropie de déplacement chimique créée par les 4 cycles aromatiques contenus dans l'hème participe à la dispersion des déplacements chimiques et donc facilite l'attribution.

Cependant, la connaissance des déplacements chimiques des noyaux d'une protéine, obtenus dans un laboratoire dans des conditions données (température, pH, concentration notamment) ne suffit pas nécessairement pour attribuer les spectres enregistrés dans des conditions légèrement différentes. S'ensuit alors une étape laborieuse de réattribution. C'était le cas par exemple du lysozyme T4, dont les cavités hydrophobes ont été explorées en utilisant du xénon comme sonde (voir paragraphe III-C).

L'attribution de protéines paramagnétiques est rendue compliquée par les interactions des noyaux de la protéine, en particulier les protons, et les densités de spin des centres paramagnétiques. Ainsi, le temps de relaxation transversal T_2 est raccourci, ce qui entraîne un élargissement des signaux, donc une résolution moindre, et une perte de signal lors de l'utilisation de séquences multidimensionnelles, notamment celles nécessitant une évolution des cohérences dans le plan transversal xy. Dans le cas des ferrédoxines, l'emploi des séquences classiques TOCSY, NOESY et HMQC adaptées au niveau des temps de mélange, taux de répétition et nombre d'acquisitions, a suffi à attribuer les protons et carbones des cystéines liées aux centres paramagnétiques.

I-C-3. Contraintes structurales de protéines paramagnétiques

Les contraintes expérimentales généralement utilisées lors de calculs de structures de protéines diamagnétiques, sont plus difficiles à obtenir pour des protéines paramagnétiques mais apportent une plus grande quantité d'information. Ainsi, la relaxation dipolaire croisée proton-proton (séquence NOESY), est-elle concurrencée par les interactions dipolaires spin nucléaire-spin électronique et peut devenir indétectable. Lorsque ces connectivités sont observées, il reste difficile de les convertir en contraintes de distance. De même, les contraintes d'angle dièdre liées à la mesure de couplage ^3J et les contraintes d'orientation de vecteurs par rapport à un repère moléculaire, obtenues en mesurant les couplages dipolaires résiduels en milieu faiblement orienté, sont souvent difficiles à estimer.

D'autres contraintes structurales spécifiques aux protéines paramagnétiques sont toutefois disponibles.

a) Angles dièdres Fe-S_γ-C_β-H_β de centres $[4Fe\text{-}4S]^{2+}$

Le déplacement chimique des protons β de cystéines liées à un centre $[4Fe\text{-}4S]^{2+}$ est la résultante de trois composantes.

$$\delta = \delta_{dia} + \delta_{para\ dip} + \delta_{para\ scal} \qquad \textbf{(2)}$$

Le premier terme correspond à la contribution diamagnétique. Elle est inconnue, mais sa valeur peut être estimée au moyen de tables obtenues pour des protéines diamagnétiques [**12**] et sa dispersion évaluée à partir des déplacements chimiques de rubrédoxines, protéines à un ion de fer liées aux 4 soufre en position γ de 4 cystéines, et dans lesquelles le fer a été remplacé par un ion diamagnétique. Cette dispersion est faible (environ 0,4 ppm) au regard de la dispersion des déplacements chimiques des protons β de cystéines observés.

Le deuxième terme, $\delta_{para\ dip}$, déplacement chimique paramagnétique dipolaire, est lié à l'anisotropie du tenseur g du cluster. De par l'équivalence des 4 ions de fer dans le premier état excité, paramagnétique, l'anisotropie est probablement très faible.

Le troisième terme, $\delta_{para\ scal}$, déplacement chimique paramagnétique scalaire, provient de la présence de densité de spin au niveau des noyaux, via les orbitales atomiques de type σ. Cette densité de spin est transmise depuis le centre [4Fe-4S] via les liaisons, de manière équivalente pour tous les protons β de cystéines. Mais elle peut aussi provenir du recouvrement de l'orbitale 2p des soufres γ des cystéines avec le proton β (figure 5-A). Ce terme, lié à la valeur de l'angle dièdre Fe-S_γ-C_β-H_β, fournit une importante information structurale. Les données sont alors ajustées au moyen d'une équation de type Karplus :

$$\delta = A + B\cos\theta + C\sin 2\theta \qquad \textbf{(3)},$$

où θ est l'angle dièdre mesuré à partir de la structure préliminaire obtenue par cristallographie aux rayons X d'une ferrédoxine analogue, celle de la bactérie *Clostridium acidurici*. Ces données structurales n'ont pas suffi à expliquer le déplacement chimique d'une des cystéines de Cv Fd, C40 (figure 5-B). Nous avons invoqué une répartition inégale de la densité de spin sur le centre [4Fe-4S] lié à C40, elle-même due à la conformation particulière d'une boucle de la protéine [**13**].

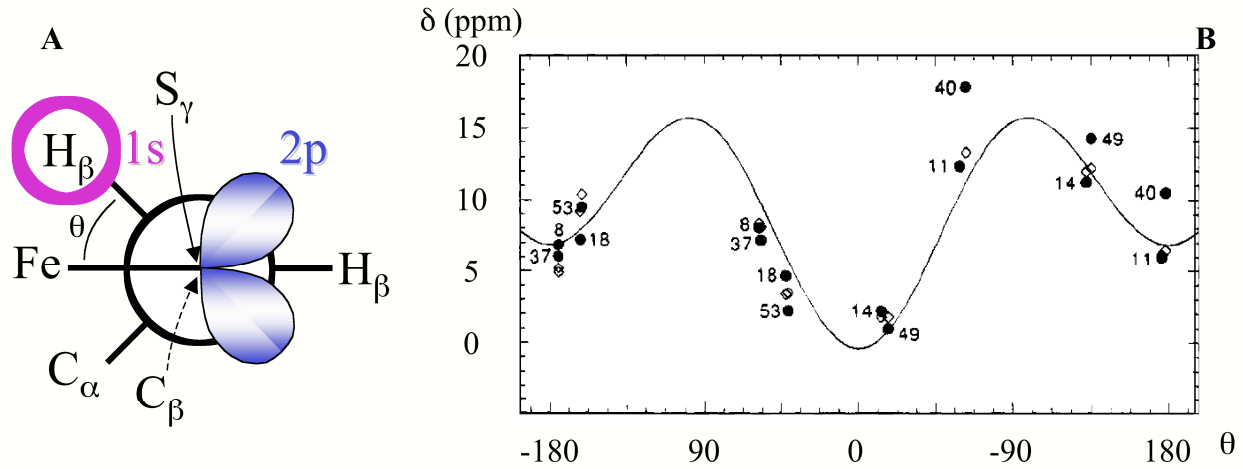


Figure 5 : (A) Recouvrement des orbitales non liantes du S_γ et de l'orbitale 1s des H_β d'une cystéine ligand d'un centre [4Fe-4S]. (B) déplacement chimique des H_β de cystéines de la ferrédoxine de *Chromatium vinosum* (Cv Fd) en fonction de l'angle dièdre spectre Fe-S_γ-C_β-H_β.

b) Distance aux centres [4Fe-4S] par la mesure du T_1 des protons

L'interaction dipolaire entre la densité de spin électronique au niveau des centres [4Fe-4S] et les noyaux de la protéine, en particulier les protons, entraîne une diminution du T_1 qui dépend de la distance aux centres paramagnétiques et de la répartition de la densité de spin.

Pour mettre en valeur cette propriété, nous avons mesuré le T_1 des protons de la HiPIP de *Chromatium vinosum* dans ses états oxydés et réduits. Nous avons employé une séquence d'inversion-récupération, sous sa forme classique, ou complétée d'un module d'édition TOCSY pour les signaux non résolus sur un spectre 1D. Nous avons soustrait une estimation moyenne de la composante diamagnétique, identique à tous les protons, pour ne garder que la composante paramagnétique T_{1par}. Nous avons fait l'hypothèse que la densité de spin était localisée sur les ions de fer, et qu'elle ne dépendait que de leur état d'oxydation.

Dans l'état réduit, les 4 fers sont équivalents. La distance réduite $D_{red}(H)$ de chaque proton H au centre [4Fe-4S] est alors calculée, au moyen de la structure cristallographique de la protéine [**14**] (Carter et al., 1974) à partir des distances $d(Fe_i, H)$ à chaque ion de fer selon :

$$D_{red}(H) = \left(\sum_{Fe_i} d(Fe_i, H)^{-6} \right)^{-\frac{1}{6}} \qquad \textbf{(3)}$$

Nous avons observé une forte adéquation entre les T_{1par} des protons et leur distance réduite (figure 6). La déviation observée pour le proton amidique de F48 met en lumière une différence de conformation de la chaîne protéique en solution et dans un cristal [**15**].

Dans l'état oxydé, nous avons tenu compte de la nature différente des 4 ions de fer, qui entraîne une densité de spin différente, estimée par ailleurs [**16**]. La distance réduite inclut alors le carré de la densité de spin sur chaque fer. En calculant le coefficient de régression de $\ln(T_{1par})$ fonction de $\ln(D_{red})$ pour chacune des 12 positions possibles de l'ion Fe^{3+}, des deux ions $Fe^{2,75+}$ et de l'ion $Fe^{2,5+}$, nous avons attribué ces 4 ions sur la structure de la protéine. Ces résultats sont en accord avec ceux précédemment obtenus par RMN sur une HiPIP analogue [**17**].

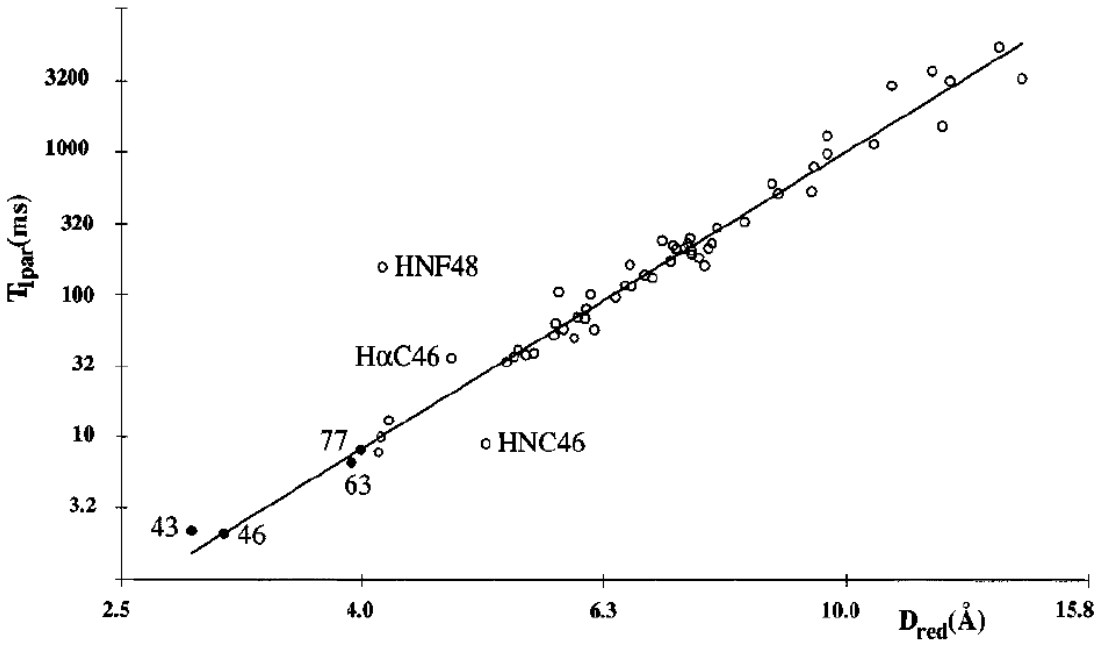


Figure 6: Composante paramagnétique de T_1 (T_{1par}) de chaque proton en fonction de leur distance réduite au centre [4Fe-4S], en échelle logarithmique, pour la HiPIP réduite. Les protons β de cystéines sont indiqués par des ronds pleins, et certains protons remarquables sont précisés.

c) Couplages dipolaires résiduels d'un cytochrome sans milieu orientant

Au cours de mon premier séjour post-doctoral, j'ai eu l'occasion de développer des aspects méthodologiques concernant les contraintes structurales de mesure du couplage dipolaire résiduel, ou rdc (pour "residual dipolar coupling"). Le rdc provient d'une légère anisotropie d'orientation des molécules dans le champ magnétique, généralement créé par un cristal liquide dilué. Dans le cas de protéines paramagnétiques fortement anisotropes comme des cytochromes, la dépendance de l'énergie potentielle d'interaction de la protéine selon son orientation, de nature tensorielle, est suffisamment importante pour que l'on puisse s'affranchir du cristal liquide. Nous avons choisi d'étudier un cytochrome b5 enrichi en azote 15 [**18**]. Le fer de cette protéine de 94 résidus, au centre de l'hème, est relié par deux liaisons covalentes à l'azote ε de 2 histidines.

Comme les cytochromes c, les cytochromes b5 possèdent deux états d'oxydation : dans l'état oxydé, paramagnétique, le cœur de l'hème possède un ion ferrique, alors qu'il est ferreux dans l'état réduit, diamagnétique. Le tenseur de susceptibilité magnétique a été mesuré pour les deux états redox de la protéine et à deux champs magnétiques, 18,8 et 11,7T, pour profiter du fait que les rdc dépendent du carré du champ magnétique extérieur B_0.

Dans l'état réduit, diamagnétique, la structure en solution déterminée précédemment [**19**] au moyen des seules contraintes NOEs, a été raffinée en incluant les contraintes d'orientation des vecteurs ^{1}H-^{15}N par rapport à un même tenseur d'anisotropie, $\Delta\chi_{dia}$ [**18**]. Ce tenseur peut être assimilé au tenseur de l'hème, puisque l'anisotropie due aux cycles aromatiques des acides aminés et celle liée aux autres liaisons covalentes sont inférieures de respectivement un et deux ordres de grandeur.

Dans l'état oxydé, paramagnétique, intervient l'anisotropie de l'ion ferrique. Le tenseur que l'on observe grâce aux couplages dipolaires résiduels, $\Delta\chi_{mol}$, est alors la somme, tensorielle, des tenseurs dus à l'ion ferrique $\Delta\chi_{para}$ et à l'hème. En considérant, comme cela a été observé sur la structure en solution [**20**], que l'orientation de l'hème par rapport à la chaîne protéique diffère peu selon l'état d'oxydation du fer, le tenseur dû à l'hème peut être assimilé à celui observé pour les protéines réduites $\Delta\chi_{dia}$: $\Delta\chi_{mol} = \Delta\chi_{para} + \Delta\chi_{dia}$. Afin de vérifier cette hypothèse, $\Delta\chi_{para}$ a été déterminé expérimentalement au moyen des contraintes d'anisotropie de déplacement chimique. En effet, le déplacement chimique des noyaux de la protéine résulte de la somme de 3 termes principaux : une composante diamagnétique, une composante d'anisotropie due à l'hème, et une composante d'anisotropie due à l'ion ferrique, paramagnétique, de la forme oxydée. Les deux premières sont identiques pour les deux états d'oxydation de la protéine, en estimant comme observé que les structures en solution des deux formes sont similaires [**20**]. La mesure de la différence de déplacement chimique des mêmes noyaux, en particulier des protons, dans les deux états redox, permet de calculer le tenseur $\Delta\chi_{para}$.

Ce travail a donc permis de montrer la cohérence entre trois tenseurs déterminés expérimentalement et indépendamment.

I-C-4. Structure en solution d'une protéine diamagnétique

J'ai aussi participé à la détermination de la structure du cytochrome c de cœur de cheval, réduit, donc diamagnétique [**11**]. Cette protéine de 105 acides aminés avait été résolue dans la forme réduite par cristallographie aux rayons X [**21**] et dans la forme oxydée par RMN [**22**]. Afin de mettre en évidence les différences structurales entre les deux états d'oxydation, qui peuvent avoir une incidence sur les propriétés physiologiques de la protéine, nous avons décidé de préciser sa structure en solution à l'état réduit. Après avoir complété son attribution, la structure de la protéine a été résolue avec une déviation standard par rapport à la structure moyenne de 0,66 Å pour les atomes lourds de la chaîne principale et 1,13 Å pour tous les atomes lourds. Cette structure est conforme aux structures précédemment citées. Seules les orientations de quelques chaînes latérales diffèrent significativement, l'une étant liée à la création d'une liaison hydrogène. L'orientation d'un des propionates de l'hème varie aussi légèrement, comme cela avait été observé sur la structure cristallographique [**21**]. En effet, une variation de l'orientation de la chaîne latérale de Asn 52 induit la perte d'une liaison hydrogène avec un propionate de l'hème.

I-D. Localisation de molécules d'eau au sein d'une protéine

L'activité d'une protéine en solution ne résulte pas uniquement de sa structure tridimensionnelle, mais est due aussi à sa capacité d'adaptation conformationnelle lui permettant d'interagir avec ses partenaires. Cette notion est regroupée sous le terme générique de dynamique et inclut des échelles de temps très diverses. La dynamique des protéines hydrosolubles est due non seulement aux déplacements électroniques et atomiques, mais aussi au milieu aqueux dans lequel elles baignent. Les molécules d'eau jouent certainement par ailleurs un rôle dans la structuration tridimensionnelle des protéines, en restituant progressivement de l'entropie au système solvant + protéine. En effet, les régions hydrophobes d'une protéine entièrement dépliée sont probablement entourées d'eau structurée, de faible entropie. Le rapprochement de chaînes latérales hydrophobes libèrent certaines de ces molécules d'eau permettant au système de récupérer de l'entropie. Il est donc important de caractériser les molécules d'eau en interaction avec la protéine. Ces molécules d'eau se répartissent grossièrement en trois familles : celles dont les propriétés sont semblables à un échantillon de solvant pur, celles constituant la couche d'hydratation superficielle de la protéine, et enfin celles présentent dans des cavités d'accès restreint à la surface. Il est probable que, dans des conformations rares de la protéine, des molécules d'eau se retrouvent dans des zones très peu accessibles. La détection de l'échange isotopique de protons amidiques, jusqu'à des échelles de temps très longs, rend compte de l'existence de ces formes. Seules les molécules d'eau de la troisième catégorie ont une durée caractéristique de présence en une même position de la protéine du même ordre de grandeur ou supérieure au temps caractéristique de rotation de cette dernière, ce qui leur confère des propriétés de relaxation particulières. Cette recherche toujours très active [**23**] implique des techniques complémentaires apportant des informations structurales (cristallographie aux rayons X, RMN haute résolution) et dynamiques (dispersion par relaxation RMN, NOESY, spectroscopie femtoseconde [**24**]) sur ces molécules d'eau.

Dans ce contexte, je me suis intéressé à démontrer la présence de molécules d'eau dans le cytochrome c de cœur de cheval sous sa forme oxydée [**25**], et à préciser leur temps de résidence [**25**, **26**]. Nous avons utilisé des séquences spécifiques de type ePHOGSY (figure 7) [**27**], qui dérivent de la séquence classique NOESY pour observer les interactions entre le solvant et les protons de la protéine. Dans la version monodimensionnelle, la séquence ePHOGSY débute par la sélection du signal des protons de l'eau par une impulsion sélective 180°, simple ou composite, entourée de deux gradients identiques, qui a pour objet de défocaliser tous les signaux résonnant à une fréquence différente de celle du solvant. Puis, la relaxation longitudinale croisée entre les signaux s'opère durant un temps de mélange. Enfin, le signal du solvant est défocalisé par un train d'impulsions composites entouré de gradients de type WATERGATE. Ainsi, seules apparaissent, sur un spectre 1D, les interactions entre les protons de l'eau et ceux de la protéine. Pour augmenter la résolution, nous avons aussi enregistré un spectre 2D PHOGSY-NOESY, en éditant les signaux du spectre précédent par une séquence de type NOESY. Ici encore, la nécessité de posséder des informations sur le plus grand nombre possible de protons de la protéine implique d'augmenter la résolution par une dimension supplémentaire.

Les spectres proton à 600 MHz présentent tous des signaux de même signe que sur le spectre issu d'une simple impulsion 90°. Ceci montre que le temps de corrélation de l'interaction dipolaire proton aqueux – proton de la protéine est supérieur à 300 ps. Le temps de corrélation est fixé par la plus petite des deux composantes suivantes :

- d'une part, le temps de rotation du vecteur reliant les deux protons dans le champ magnétique est nécessairement voisin du temps de rotation de la protéine entière, lorsque sont prises en considération les molécules d'eau localisées dans des cavités de la protéine. Ce temps a été mesuré à 5,2 ns à 25°C [**28**],
- d'autre part, le temps durant lequel l'interaction dipolaire a effectivement lieu, c'est-à-dire le temps de résidence du proton aqueux à proximité du proton de la protéine.

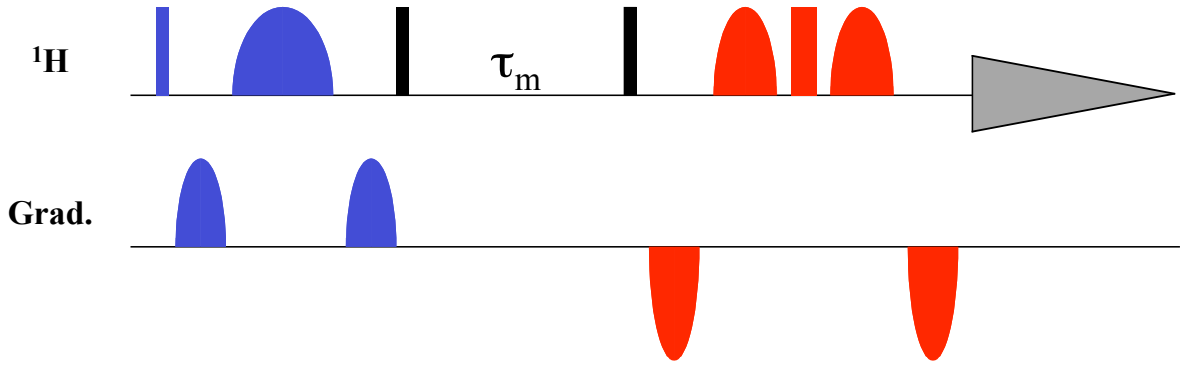


Figure 7: Schéma de principe de la séquence ePHOGSY. Les barres fines sont des impulsions 90°, les barres épaisses des 180°. Les impulsions sélectives sont centrées sur le déplacement chimique de l'eau. Le début de la séquence, en bleu, sert à défocaliser tous les signaux sauf ceux à la fréquence de résonance de l'eau, ou à proximité immédiate. Après une seconde impulsion 90°, un scan sur deux comme pour la séquence NOESY, la relaxation dipolaire croisée entre les protons de l'eau et ceux de la protéine est active. Après une troisième impulsion 90°, un schéma "WATERGATE", en rouge, permet la suppression des signaux du solvant.

Nous avons donc pu en conclure que le temps de résidence de ces molécules d'eau était supérieur à 300 ps. Une limite supérieure peut être estimée en observant que l'échange des protons aqueux entre le solvant et les cavités de la protéine est rapide par rapport aux différences de déplacements chimiques. Même si les déplacements dans les différents environnements ne sont pas connus, la sensibilité des déplacements chimiques de protons aqueux est importante, et dépend notamment de la possibilité pour l'oxygène de former ou non des liaisons hydrogène. Il en résulte une différence de déplacement chimique des protons de 3 ppm entre l'eau comme solvant et une trace d'eau dans le chloroforme [**29**]. On peut alors estimer que le temps de résidence d'une molécule dans des cavités du cytochrome c de cœur de cheval est inférieur à 1 ms.

Au-delà de l'estimation de ce temps de résidence, une information structurale précise est de grande importance. Une des molécules d'eau, précédemment observée par cristallographie dans la cavité distale de l'hème, dans la forme réduite de la protéine, est susceptible d'être impliquée dans la stabilisation des deux états redox. L'approche par cristallographie aux rayons X ne permet d'observer que l'oxygène de l'eau, et à condition que sa mobilité soit suffisamment limitée pour observer une densité électronique. La RMN donne des informations sur la position moyenne des deux protons de chaque molécule d'eau. Cependant, l'approche RMN à haute résolution est rendue complexe du fait de l'unicité du déplacement chimique de tous les protons du solvant aqueux, de l'existence de protons de même déplacement chimique que le solvant, et de l'échange existant entre les protons du solvant et ceux de le protéine.

Nous avons choisi d'élaborer un programme permettant de trier, parmi les 241 interactions protons aqueux - protons de la protéine observées, celles qui provenaient indubitablement d'interactions dipolaires avec des molécules d'eau placées dans des cavités. A l'aide de la structure cristallographique [**30**], les protons proches (moins de 5 Å) d'un proton résonnant à moins de 0.3 ppm du signal de l'eau, et qui aurait ainsi pu ne pas être sélectionnés par la première partie de la séquence ePHOGSY, ont été écartés. Une carte d'hydrophilicité de la protéine a alors été dressée à partir des contraintes restantes. Les protons rapidement échangeables, à l'exclusion donc des protons amidiques qui s'échangent lentement devant l'inverse du temps de mélange employé dans la séquence ePHOGSY, peuvent être à l'origine de NOE observés sur des protons voisins. Nous avons donc dans un deuxième temps supprimé tous les protons situés à moins de 4 Å d'un proton rapidement échangeable. Les six contraintes restantes ont permis d'assurer la présence de trois molécules d'eau au sein de la protéine, parmi les six molécules d'eau suggérées dans des travaux précédents de RMN haute résolution [**31**, **32**]. L'une d'elles est située dans la cavité distale de l'hème, dans une position différente de celle qu'elle occupe dans la forme réduite de la protéine [**33**].

I-E. Mesure des vitesses d'échange électronique

Les ferrédoxines à un ou deux centres [4Fe-4S] sont impliquées dans des transferts électroniques cellulaires. Elles interagissent avec un grand nombre d'autres enzymes et participent ainsi à des réactions essentielles pour la cellule, comme la transformation de l'azote moléculaire en ammoniaque ou du dioxyde de carbone en formiate. Ces protéines de faible poids moléculaires sont aussi de bons modèles pour des métalloprotéines ou des complexes protéiques de plus grande taille, qui possèdent aussi des centres [4Fe-4S]. La très grosse protéine qui constitue le photosystème I, un des deux systèmes photosynthétiques en contient 3. Enfin, ces ferrédoxines sont à même de mieux nous faire comprendre comment s'opère le transfert électronique à grande distance, puisque les deux centres [4Fe-4S] sont séparés de 12Å environ.

J'ai abordé la mesure de vitesses de transfert électronique dans de telles protéines. XXXXX HD Au delà de 10 ppm, le spectre RMN du proton d'échantillons partiellement réduits de ferrédoxines clostridiales montre des signaux semblables aux signaux de ferrédoxines entièrement réduites, c'est-à-dire pour lesquelles les deux centres [4Fe-4S] sont réduits. D'autres sont comparables aux signaux de ces échantillons entièrement oxydés, et sont attribués aux protons β de cystéines liées aux centres paramagnétiques. Cette attribution stéréospécifique est réalisée par les méthodes classiques d'attribution exposées dans la partie I-C-2. Enfin, une série de nouveaux signaux sans équivalents dans les formes oxydées et réduites apparaît. Les signaux sont corrélés trois par trois, un dans chacune des séries précédemment décrites, sur un spectre EXSY. L'objet d'un tel spectre est de corréler différents environnements de noyaux, induisant des déplacements chimiques différents, en échange lent à l'échelle des différences de déplacement chimique, mais rapide ou du même ordre de grandeur que le temps de mélange utilisé dans la séquence RMN.

L'interprétation des spectres est alors aisée. Dans un échantillon de ferrédoxines partiellement réduites, une partie des molécules possèdent deux centres réduits. On notera les signaux correspondants RR. Une autre partie possède deux centres oxydés (OO). Enfin, certaines ferrédoxines possèdent un centre oxydé et un autre réduit, et le passage de l'électron supplémentaires d'un centre [4Fe-4S] à l'autre est rapide devant la différence de déplacement chimique entre les deux environnements extrêmes. Les signaux correspondant résultent donc de l'échange rapide entre les formes OR et RO.

Les corrélations observées sur le spectre EXSY permettent d'attribuer les signaux à chaque proton β de cystéines dans chacun des trois environnements RR, OR/RO et OO. La cinétique du transfert électronique peut alors se déduire des propriétés RMN des signaux observées. La vitesse de l'échange électronique intermoléculaire peut en principe se mesurer à partir de l'intensité des pics de corrélation de chaque proton observés sur au moins un spectre EXSY. Cependant, le taux de réduction d'un tel échantillon variant significativement durant le temps d'acquisition d'un tel spectre bidimensionnel, cette mesure ne serait pas précise. Une limite supérieure est en revanche aisément obtenue en remarquant que les signaux des formes RR et OO ne sont pas significativement élargis lorsque l'échantillon est partiellement réduit. Cette limite a été estimée à $10^5\ M^{-1}s^{-1}$ dans le cas de Cp Fd [**34**].

Nous nous sommes plus particulièrement intéressés à la mesure de la vitesse d'échange électronique intramoléculaire k dans les ferrédoxines semi-réduites. On peut estimer, comme cela a été observé pour les formes oxydées et réduites de la protéine, que l'échange électronique intermoléculaire élargit de manière négligeable les signaux caractéristiques des ferrédoxines semi-réduites. Les largeurs de ces signaux s'expriment alors selon :

$$\Delta\nu_{1/2\,OR/RO} = f_{OR}\Delta\nu_{1/2\,OO} + f_{RO}\Delta\nu_{1/2\,RR} + \pi f_{OR}f_{RO}\left[2\pi(\nu_{OO}-\nu_{RR})^2\right]k^{-1} \qquad \textbf{(4)},$$

où chaque premier indice se réfère au cluster auquel est lié le proton dont on observe le signal, et chaque second indice à l'autre cluster. $\Delta\nu_{1/2\ OO}$ et $\Delta\nu_{1/2\ RR}$ sont les largeurs de raie des signaux correspondants pour les ferrédoxines entièrement oxydées et entièrement réduites, et ν_{OO} et ν_{RR} les fréquences de résonance de ces signaux. On suppose en effet que le degré d'oxydation de l'autre centre [4Fe-4S] n'influence pas significativement cette largeur de raie. f_{OR} et f_{RO} sont les fractions de temps f durant laquelle chaque cluster est réduit. Elles se calculent aisément selon la formule

$$f_{OR} = 1 - f_{RO} = (\delta_{OR/RO} - \delta_{RR})/(\delta_{OR/RO} - \delta_{OO}) \qquad \textbf{(5)}$$

La grande différence de déplacement chimique de certains protons avec le degré d'oxydation de la ferrédoxine, qui peut dépasser 40 ppm, permet de mesurer ces vitesses d'échange avec une précision de l'ordre de 20%. Une vitesse $k = 6 \pm 1.3\ 10^{-6}\ s^{-1}$ a été mesurée pour Cp Fd.

Pour commenter cette valeur, il convient d'introduire brièvement la théorie du transfert électronique en milieu biologique dans l'hypothèse non adiabatique. K s'exprime alors selon :

$$k = \frac{2\pi}{\hbar} V^2 F \qquad (\mathbf{5\text{-}1})$$

où V est le facteur de couplage électronique et F le facteur nucléaire de Franck-Condon. V^2 dépend de la distance R séparant les deux partenaires selon une loi en $\exp(-\beta R)$, où β est un coefficient qui dépend du milieu rencontré au cours du transfert.

F s'exprime par :

$$F = (4\pi\lambda kT)^{\frac{1}{2}} \exp\left[-\frac{(\Delta G^0 + \lambda)^2}{4\lambda kT}\right] \qquad (\mathbf{5\text{-}2})$$

où T est la température, ΔG^0 la force motrice de la réaction et λ l'énergie de réorganisation. La vitesse de transfert électronique est maximal lorsque $\Delta G^0 = -\lambda$. Or il a été montré que le logarithme de la vitesse de transfert électronique en milieu biologique dépend linéairement de la distance entre les deux centres, pour un grand nombre de systèmes [**35**], pour lesquels $\Delta G^0 = -\lambda$. La vitesse mesurée pour Cp Fd est, par rapport à la droite de régression, trop faible par rapport à la distance entre les centres [4Fe-4S], et ce que l'on adopte comme distance R le centre des clusters ou le centre des paires de fer impliqués dans l'échange. Ceci signifie que pour Cp Fd, $\Delta G^0 \neq -\lambda$, et que le transfert électronique n'est pas optimal. La différence de potentiel redox entre les deux centres [4Fe-4S] de Cp Fd, mesurée par la connaissance précise des fractions f_{OR} et f_{RO} s'est révélée très faible, de 15 mV pour Cp Fd par exemple [**34**]. ΔG^0 est estimé à 30meV. La valeur de k s'est révélée constante, aux erreurs expérimentales près, dans la gamme de température de 283 à 308K. Ceci aboutit à une limite supérieure de λ de 0,6 eV, donc très inférieure à celle observée dans d'autres systèmes biologiques [**36**].

Dans l'objectif de préciser le mécanisme de saut électronique entre les deux centres polymétalliques, la vitesse électronique intramoléculaire a été mesurée dans divers mutants de Cp Fd, et notamment pour le mutant I23V, c'est-à-dire pour lequel l'isoleucine 23 est remplacée par une valine. En effet, le méthyle manquant dans la valine était considéré comme un intermédiaire possible pour le transfert électronique, au vu de la structure cristallographique à haute résolution d'une ferrédoxine analogue, Ca Fd [**37**]. Cependant, toutes les vitesses mesurées se sont révélées comparables à celle de Cp Fd native. Il semble donc que plusieurs chemins coexistent, et que la suppression de l'un d'eux ne limite pas significativement l'échange électronique.

Enfin, les fractions f_{OR} et f_{RO} donnent avec une grande précision la différence de potentiel redox des deux centres [4Fe-4S]. Ainsi, cette différence est estimée à 15 mV pour Cp Fd, et de 0 à 26mV pour les différents mutants testés.

Contrairement aux ferrédoxines clostridiales (Cp Fd et Cau Fd), Cv Fd ne montre pas de signaux caractéristiques de protéines semi-réduites en échange rapide entre formes OR et RO [**13**]. Le spectre EXSY n'a pas révélé d'échange entre les signaux attribués à la forme oxydée et une nouvelle série de signaux apparaissant lors de la réduction partielle de la ferrédoxine. Sur le mutant C57S, dont le spectre proton de la protéine partiellement réduite donne des signaux aux déplacements chimiques et largeurs très voisins de la protéine native, des corrélations EXSY ont été observées (Figure 8). Cette découverte a permis de se rendre compte que le potentiel d'oxydoréduction du cluster I de Cv Fd était très inférieur, -660 mV, au potentiel du cluster II, -460 mV, potentiel très similaire à celui observé dans les clusters des ferrédoxines clostridiales [**38**]. Ce résultat est contraire à ce qu'indiquait une première mesure par électrochimie [**39**, **40**]. Ceci semble étonnant car la comparaison des séquences primaires montraient davantage de différence autour du cluster II, par l'insertion de 6 acides aminés supplémentaires entre la 2ème et la 3ème cystéine du motif classique CxxCxxC de ligation du centre [4Fe-4S]. L'observation des signaux croisés provient d'une augmentation de 60 mV du potentiel

d'oxydoréduction de C57S au niveau du cluster I par rapport à la protéine native. L'échange électronique a alors lieu entre une ferrédoxine OO et une ferrédoxine OR. L'électron supplémentaire du cluster II de la ferrédoxine OR peut alors passer sur le cluster I et de là être transféré sur la ferrédoxine oxydée par échange électronique intermoléculaire. L'étude d'autres mutants de Cv Fd par RMN, mais aussi par RPE, Mössbauer et électrochimie, a confirmé cette hypothèse, sans que soit clairement établie l'origine du potentiel chimique particulièrement bas du cluster I [**41**, **42**].

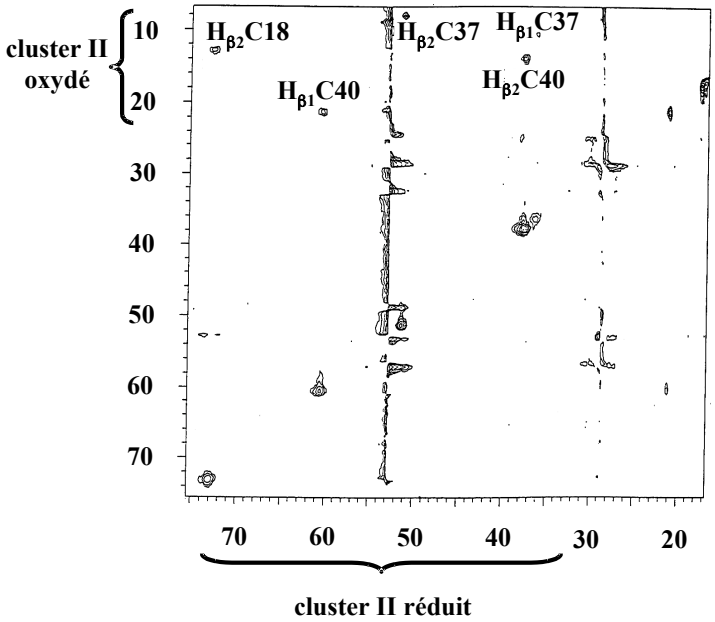


Figure 8: Partie bas champ d'un spectre 2D EXSY du mutant C57S de Cv Fd, 500 MHz, 25°C.

II. Le xénon : sonde exogène de cavités hydrophobes

Dans la première partie de mon cursus de recherche, je me suis surtout employé à améliorer la caractérisation de biomolécules en exploitant les propriétés de leurs spins nucléaires, ou de ceux du solvant environnant. Des informations complémentaires de grand intérêt peuvent aussi être obtenues par l'emploi de molécules ou d'atomes interagissant physiologiquement avec ces biomolécules, ou bien encore à l'aide de sondes exogènes. Parmi ceux-ci, l'emploi de xénon présente plusieurs avantages décisifs.

II-A. Propriétés du xénon

Le xénon est un gaz rare. Il est susceptible de réagir avec des composés riches en électron, comme F_2, pour donner des molécules (XeF_2, XeF_4) ou des oxydes ($XeOF_4$) [**43**]. Cependant, des conditions expérimentales particulières, notamment une température très élevée, sont généralement nécessaires pour que ces réactions aient lieu. Le xénon peut donc être considéré comme inerte chimiquement dans les conditions que nous rencontrons expérimentalement.

Pour autant, le xénon interagit de manière conséquente avec son environnement. Son nuage électronique, fortement polarisable, induit des forces de van der Waals attractives. De par son caractère hydrophobe, le xénon est particulièrement sujet aux forces de London, c'est-à-dire aux interactions dipôle induit – dipôle induit. Son interaction avec d'autres atomes ou groupements fortement polarisables est donc source de stabilisation. Les énergies impliquées sont de l'ordre de quelques kT. Cependant, les forces de Coulomb à l'origine des interactions entre molécules ou groupements chimiques chargés sont très supérieures, de l'ordre de plusieurs centaines de kT. Ceci explique pourquoi dans un milieu polaire, comme l'eau, les groupements polaires et le solvant tendent à former des régions hydrophiles. Par opposition, les groupements apolaires et les gaz rares se regroupent dans des régions hydrophobes. Le xénon est donc une sonde spécifique des régions hydrophobes de molécules.

La polarisabilité du xénon est la plus élevée parmi les gaz rares, mis à part le radon qui ne possède pas d'isotope stable. Elle est par exemple 20 fois supérieure à celle de l'hélium. Elle est responsable de la grande solubilité du xénon dans des milieux apolaires (240 mM/bar dans le pentane à 25°C), mais aussi polaires aprotiques (103 mM/bar dans le tétrachloroéthane, à 25°C) et s'avère suffisante expérimentalement dans des solvants polaires (4,3 mM/bar dans l'eau, à 25°C). L'unité de solubilité a un sens puisque la solubilité du xénon suit la loi de Henry sur toute la gamme expérimentale de pression[1]. Notons enfin que la solubilité augmente fortement quand la température baisse. Ainsi, elle fait plus que doubler dans l'eau en passant de 25 à 1°C [**44**].

La forte polarisabilité du nuage électronique du xénon induit une grande sensibilité du déplacement chimique de son noyau à l'environnement. Seuls 2 des 9 isotopes stables du xénon sont observables par RMN. Il s'agit de l'isotope 131, de spin 3/2 et d'abondance naturelle 24%, et surtout de l'isotope 129, de spin ½ et d'abondance naturelle d'environ 26%. Dans des conditions favorables, l'interaction du xénon 129 avec son environnement est très peu efficace du point de vue de la relaxation nucléaire. Ceci implique une relaxation longitudinale T_1 très élevée. Pour fixer les ordres de grandeur, en prenant soin de supprimer les traces de paramagnétiques dans le tube RMN, et en greffant sur les fonctions silanol de la surface du tube par du 1,7-dichlorooctamethyltetrasiloxane, le T_1 du xénon 129 à température ambiante, à pression 0,3 bar est d'au moins 5 heures [**45**]. En phase liquide, dans un solvant pur deutéré, le T_1 est de l'ordre de quelques minutes. Il est fortement réduit (facteur 2 à 3) si le solvant est protoné. Enfin, en phase solide, sous un fort champ magnétique (supérieur à 0,1 T), le T_1

[1] Les données sont connues pour l'eau pure, à différentes températures. La diminution de solubilité du xénon dans l'eau à 25°C n'est que de 2% entre 1 et 6 bar. Des données de solubilité dans les alcanes saturés de 1 à 4 carbone à des températures inférieures à –78°C sont également disponibles, mais à ces températures, la pression de vapeur saturante du xénon est à peine supérieure à la pression ambiante. Loin de cette pression, les données expérimentales montrent une linéarité de la solubilité du xénon, à quelques pourcents près. Toutes les données connues justifient donc l'approximation de linéarité.

du xénon a été mesuré à environ 30 minutes à 100K [**46**]. Au contraire, le T_1 peut être très court dans des milieux contenant des impuretés paramagnétiques. Ainsi, dans le sang, le T_1 a été mesuré compris entre quelques secondes et moins d'une minute, selon le taux d'oxygénation [**47**].

Ces temps de relaxation longitudinale particulièrement longs ont été mis à profit pour augmenter considérablement la sensibilité du signal RMN du xénon 129 en le maintenant dans un état de polarisation hors d'état d'équilibre thermodynamique, encore appelé état d'hyperpolarisation.

II-B. Hyperpolarisation du xénon

Le xénon hyperpolarisé est produit au laboratoire par la méthode de polarisation par échange de spins [**45, 48**]. Cette méthode consiste à éclairer une cellule au moyen d'une lumière polarisée, produite pour le montage du laboratoire par un laser titane-sapphire de 6W pompé par un laser argon. La cellule contient un alcalin solide, en l'occurrence du rubidium, partiellement vaporisé en chauffant la cellule aux alentours de 100°C, du xénon et de l'azote. La longueur d'onde de la lumière polarisée est ajustée sur la première transition électronique de l'alcalin (figure 9A). En présence d'un champ magnétique de module B non nul, une seule transition électronique est alors permise, dépendant du sens de polarisation de la lumière. Sur la figure, il s'agit de la transition σ^+ du rubidium, entre les niveaux de spin électronique –½ de l'état fondamental et +½ du premier état excité. Des collisions égalisent les populations entre les deux états excités. Le rubidium se désexcite alors et retourne à l'état fondamental. La vitesse d'excitation du spin électronique étant plus rapide que la vitesse de relaxation électronique qui a tendance à peupler les deux états électroniques fondamentaux selon leur population de Boltzmann, on aboutit à un fort excès de rubidium à l'état de spin électronique +½. L'azote sert à supprimer la fluorescence des états électroniques du rubidium, qui agirait dans le sens de la dépolarisation de son spin électronique.

Lors de collisions entre l'alcalin et xénon 129 (ou 131), un couplage hyperfin apparaît entre le spin électronique du premier et le spin nucléaire du second (figure 9B), si bien que le xénon est fortement polarisé dans le milieu gazeux. La relaxation nucléaire du xénon étant de loin la constante de temps la plus faible impliquée dans le processus, le xénon est très fortement polarisé, en quelques minutes dans nos conditions expérimentales.

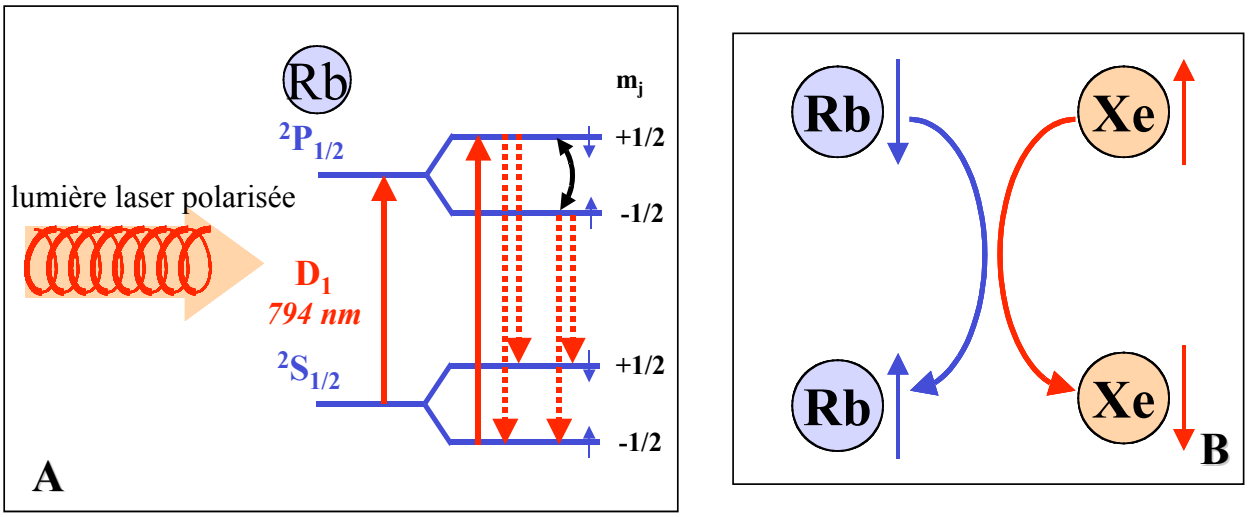


Figure 9: A) La lumière polarisée circulairement excite les spins électroniques de l'alcalin plongé dans un champ magnétique de l'état fondamental vers l'état excité selon une seule des deux transitions possibles. La désexcitation aboutit à un excès de polarisation de l'autre état fondamental. Le couplage hyperfin du spin électronique de l'alcalin avec son spin nucléaire est négligé. B) Au cours de collisions, le spin électronique de l'alcalin s'échange avec le spin nucléaire du xénon, aboutissant à un excès de population d'un état de spin nucléaire du gaz rare.

II-B-1. Aspects expérimentaux de l'utilisation du xénon polarisé

Il m'a semblé important d'exposer les principales étapes expérimentales permettant d'exploiter la très forte aimantation du xénon initialement dans la cellule de pompage, et au final dans le tube RMN contenant l'échantillon à caractériser. On se rendra ainsi compte des problématiques de physico-chimie et de RMN rencontrées.

Isolation du xénon polarisé

Pour pouvoir isoler le xénon, le mélange gazeux est refroidi, permettant ainsi au rubidium de se condenser. En effet, le spin électronique du rubidium métal pourrait faire relaxer le xénon au cours du transfert. En sortie de la cellule de pompage, le conduit par lequel passe le xénon est coudé pour être plongé dans une solution refroidie vers –50°C. A ces températures, la pression de vapeur du rubidium gazeux est de l'ordre de 10^{-12} torr et l'on estime que le résiduel de rubidium influe peu sur la relaxation du xénon. Celui-ci est ensuite envoyé vers un tube à double entrée refroidi à l'azote liquide, plongé dans un champ magnétique d'environ 0,3 T produit par une bobine résistive, et connecté en sortie à une pompe. L'azote est ainsi entraîné tandis que le xénon est condensé dans le tube. Malgré une basse tension de vapeur du xénon, de l'ordre de 4.10^{-3} torr à la température de l'azote liquide, une partie du xénon n'est pas condensé, du fait de la trop grande vitesse de passage dans le tube et de la présence d'azote gazeux qui limite le libre parcours moyen du xénon vers les parois froides du tube. Un piège refroidi à l'azote liquide est donc installé avant l'accès à la pompe et permet de récupérer une grande partie du xénon non condensé dans le tube à double entrée.

Transfert vers le tube RMN

Le champ magnétique intense dans lequel est plongé le tube à double entrée limite la relaxation longitudinale du xénon en phase solide. L'ensemble est ensuite transporté vers le champ de fuite du spectromètre RMN choisi. Le xénon est à nouveau transféré vers le tube RMN contenant l'échantillon d'intérêt, préalablement dégazé, soit en condensant le xénon au moyen d'un second point froid utilisant de l'azote liquide, soit, lorsque de très faibles pressions sont nécessaires, en détendant le xénon polarisé vers le tube. Dans ce dernier cas il est nécessaire de limiter la pression de vapeur du solvant en le plongeant dans un bain froid, mais de température supérieure à la température de congélation du xénon.

Equilibrage de l'échantillon

Pour limiter la relaxation du xénon, l'étape d'équilibrage de l'échantillon doit être la plus efficace possible, tant du point de vue thermique que de celui de la répartition du xénon entre les phases liquides et gazeuses, répartition qui doit tendre vers l'équilibre thermodynamique. Ainsi, le xénon, en cas de transfert par condensation est-il réchauffé en plongeant le tube dans un bain chaud. D'autre part, le tube est vigoureusement agité pour augmenter la surface d'échange entre les phases liquide et gazeuse. En effet, la solubilisation du xénon dans un tube RMN classique, de diamètre interne 4,2 mm, a lieu avec une constante de vitesse de l'ordre de la minute selon les solvants [**49**]. Si besoin, l'équilibrage thermique est accéléré en plongeant le tube RMN dans un bain à la température d'analyse RMN. Malgré ces précautions, et notamment du fait de la grande sensibilité du déplacement chimique du xénon dissous à son environnement et donc à la température, l'équilibrage de l'échantillon peut prendre plusieurs minutes. Des facteurs convectifs peuvent également être à l'origine de ces instabilités temporaires. Enfin, le régime stationnaire atteint peut encore présenter une inhomogénéité de par le système de régulation de l'échantillon.

Récupération du xénon, mesure de pressions, Pressions de vapeur

Une fois l'expérience terminée, le xénon est récupéré, du fait de son coût élevé. La mesure de sa pression est souvent nécessaire pour connaître précisément la quantité de gaz introduite dans le tube. Cette mesure se révèle parfois délicate. Elle consiste à détendre le gaz dans une zone du montage de volume connu, équipé d'une sonde de pression. Si la mesure en elle-même semble précise et reproductible, il est nécessaire de piéger les vapeurs de solvant par un bain froid, généralement du

méthanol à environ –90°C. Il apparaît alors un gradient de température du gaz, provoquant localement une augmentation de la densité du gaz et faussant donc la mesure de pression. Une autre méthode consisterait à peser le tube RMN pour en déduire, par différence, la masse de gaz incluse. Cependant, la reproductibilité d'une telle mesure est délicate. La mise au point d'un protocole pourrait permettre d'améliorer ce paramètre et donc d'accorder plus de confiance aux résultats de pesée.

Mesure du taux de polarisation

La mesure du taux de polarisation de xénon s'effectue en comparant un spectre de xénon polarisé et un spectre obtenu après thermalisation du xénon dans les mêmes conditions RMN, mis à part le gain de réception du signal et le nombre d'acquisitions. La répétition des acquisitions doit être suffisamment lente pour permettre entre chaque le retour à l'équilibre thermodynamique, au moins des spins nucléaires contenus dans la bobine de détection.

II-C. Séquences spécifiques au xénon polarisé

a) Mesure du temps de relaxation longitudinale du xénon

Lorsque le temps de relaxation longitudinale du xénon est long, au-delà de 30 secondes environ, la mesure du T_1 par la séquence classique d'inversion-récupération est généralement inenvisageable du fait de durées d'expérience trop longues. De plus, la diffusion du xénon depuis ou vers la bobine de détection bouleverserait la mesure, en mélangeant des noyaux de xénon polarisé thermiquement et d'autres inversés par la première impulsion de la séquence. Enfin, cette séquence nécessiterait l'emploi de xénon non polarisé par laser, au détriment de la sensibilité de l'expérience. En utilisant du xénon polarisé, le caractère irréversible de la relaxation nucléaire implique l'emploi d'une autre séquence. Celle-ci consiste à observer la décroissance de la polarisation du xénon dans le champ magnétique au moyen de très faibles impulsions, correspondant généralement à un angle de 1 à 5 degrés. Celles-ci projettent une aimantation dans le plan transversal proportionnelle à l'aimantation longitudinale. L'ajustement de l'intensité du signal enregistré en fonction des instants de leur enregistrement fournit la valeur du T_1. Pour s'affranchir de l'influence des impulsions, dont l'angle exact n'est pas connu, les durées séparant l'acquisition des spectres sont modifiées. Par exemple, l'acquisition de deux spectres à un intervalle de temps très court devant T_1 fournit l'influence de ces impulsions.

Cependant, des mesures de T_1 approchant plusieurs dizaines de minutes en phase liquide et 5 heures en phase gaz ont été rapportées [**45**, **49**]. A des constantes de temps aussi longues, d'autres phénomènes interviennent. Le T_1 mesuré est influencé par les interactions du xénon avec les spins nucléaires des parois du tube RMN. L'influence de l'impulsion sur le T_1 du xénon peut alors être sous-estimée. Enfin, l'expérience peut être assez longue pour que l'échange de xénon entre les phases liquides et gazeuses influence le résultat. Le T_1 mesuré ne rendra pas alors compte uniquement de la relaxation en phase liquide, mais aussi partiellement en phase gaz.

b) SPINOE

La preuve indéniable de la complexation du xénon par une cavité hydrophobe provient de l'observation de signaux due à la relaxation croisée xénon-proton. En effet, une condition nécessaire, mais non suffisante, pour observer cette relaxation croisée est que la distance proton-xénon soit la plus faible possible.

La séquence SPINOE, inventée en 1996 [**50**], permet d'observer le gain de polarisation de signaux proton dû à la relaxation dipolaire croisée avec du xénon polarisé, uniquement en fonction du taux de polarisation du xénon. La séquence a depuis été améliorée au laboratoire [**45, 51**] (figure 10). Une saturation très efficace de l'ensemble des signaux protons, au moyen d'une série d'impulsions et de gradients, fournit un instant de référence à cette relaxation dipolaire croisée. A son issue, durant le temps de mélange τ_m, les protons relaxent par un grand nombre de mécanismes, dont l'un provient de la relaxation dipolaire avec le spin nucléaire du xénon. Selon son sens de polarisation, ce dernier mécanisme accroît ou décroît l'aimantation résultante des protons. En inversant le sens de polarisation

du xénon durant τ_m entre chaque acquisition, ou ensemble d'acquisitions, et en retenant la différence d'intensité entre deux spectres consécutifs, seule apparaît la composante de relaxation dipolaire croisée de chaque proton avec le xénon. Si τ_m est grand devant le T_1 des protons, on atteint un état d'équilibre stationnaire, au sens des protons. Les spectres obtenus, sans faire la différence entre deux spectres consécutifs, correspondent alors aux spectres obtenus par la première version du SPINOE [**50**]. Au cours de l'avancement de l'expérience, le taux de polarisation du xénon diminue. Il peut alors être utile, pour améliorer le rapport signal sur bruit du SPINOE, d'affecter une pondération aux spectres dépendant de ce taux de polarisation [**52**].

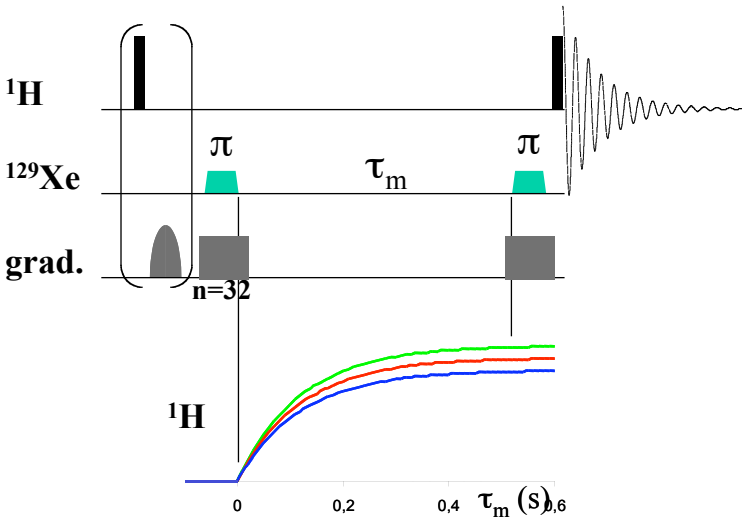


Figure 10: Séquence SPINOE. Les rectangles noirs représentent des impulsions 90° proton. Les trapèzes verts sont des impulsions adiabatiques CHIRP [**53**] destinées à inverser le signal du xénon tout en limitant sa perte de polarisation. Ils sont appliqués une acquisition (ou groupe d'acquisitions) sur deux. En partant d'une polarisation positive du xénon, l'intensité des signaux proton suivent la courbe verte, fonction du temps de mélange τ_m, lorsque sont appliquées les impulsions CHIRP. Lorsqu'elles ne sont pas appliquées, les signaux suivent la courbe bleue. La courbe rouge correspond à l'absence de xénon polarisé. Par différence entre les courbes verte et bleue, seule la partie du signal proton provenant d'une interaction dipolaire avec le xénon est visible.

Pour observer cette corrélation SPINOE, il est nécessaire d'être dans des conditions structurales et dynamiques favorables, malgré le caractère fortement polarisé du xénon. Trivialement, le xénon et le proton doivent être proches spatialement, puisque la relaxation croisée est fonction de r^{-6}, r étant la distance séparant les deux noyaux. Pour que l'interaction dipolaire soit efficace, elle doit s'opérer durant un temps de corrélation τ_c de l'ordre de grandeur de $(2\pi(\nu_H+\nu_{Xe}))^{-1}$, où ν_H et ν_{Xe} sont les fréquences de résonance respectives du proton et du xénon (figure 11). τ_c possède deux composantes τ_{rot} et τ_{res}, respectivement les temps caractéristiques de rotation des vecteurs Xe-H dans le champ magnétique, et de présence du xénon à proximité du proton : $\tau_c^{-1} = \tau_{rot}^{-1} + \tau_{res}^{-1}$. Le plus court des temps τ_{rot} et τ_{res} est le terme prépondérant. Le transfert le plus efficace a lieu pour un temps de résidence de l'ordre de 1 ns. A des temps de résidence plus élevés, l'efficacité de la relaxation croisée diminue au regard de la relaxation directe du xénon (figure 11-droite).

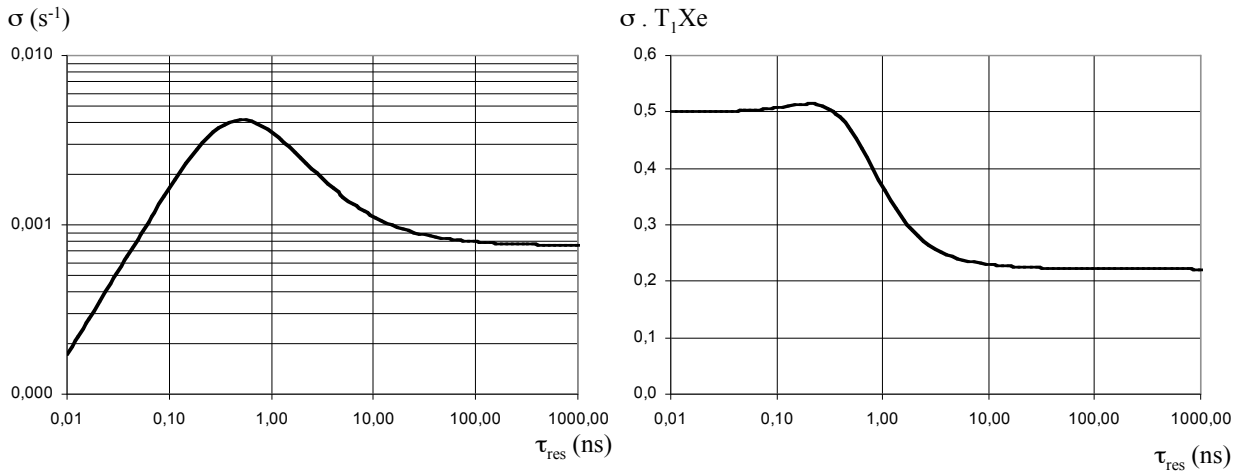


Figure 11: Relaxation croisée xénon-proton σ (à gauche) et produit de σ par la relaxation dipolaire du xénon (à droite), en fonction du temps de résidence du xénon à 3,3 Å du proton considéré et dans la même orientation du vecteur xénon-proton dans un repère propre à la molécule. Autres conditions : τ_{rot} = 5 ns, champ magnétique externe B_0 = 11,7 T.

La figure 12 montre un exemple de spectre SPINOE de protéine [**54**]. On observe que les interactions xénon-proton sont beaucoup plus intenses dans la région des protons de chaînes latérales hydrophobes, à champ plus fort que 2 ppm (figure 12C), montrant ainsi que le xénon est une sonde spécifique des régions hydrophobes.

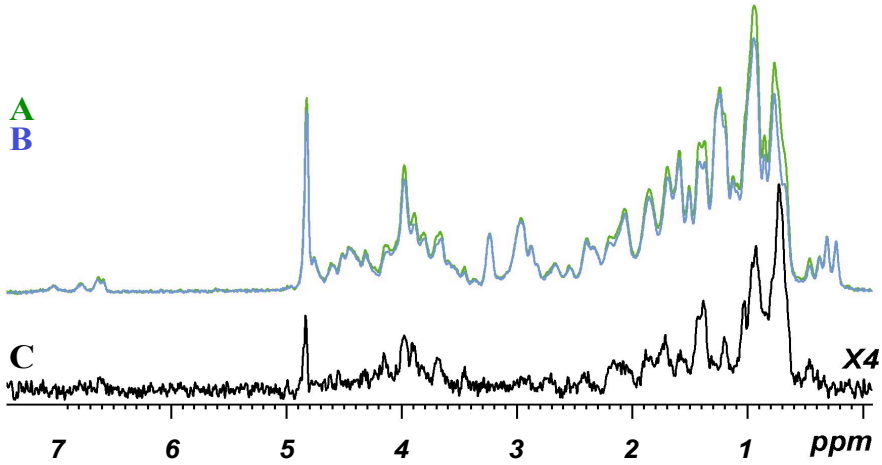


Figure 12: Spectres proton de la LTP de tabac (Cf. III-D) obtenus à l'aide de la séquence SPINOE (figure 10), pour un temps de mélange de 500 ms [**54**] : (A) en vert, avec un xénon polarisé positivement (dans le même sens que la polarisation thermodynamique), (B) en bleu, xénon polarisé négativement, c'est-à-dire en incluant les impulsions CHIRP (figure 10) et (C) différence entre les deux spectres. Conditions expérimentales : 11,7T, 20°C, 3 bars de xénon.

c) SPIDER

Récemment, un concept de polarisation de tout type de noyau a été développé au laboratoire [**55**]. Les interactions dipolaires à courtes distances entre noyaux sont moyennées à zéro du fait du changement permanent d'orientation relative du vecteur internucléaire par rapport au champ magnétique externe. En revanche, à plus grande distance, elles ne sont plus moyennées car les noyaux ne changent pas significativement de position relative durant le temps classique en RMN où opère l'interaction. Malgré la décroissance rapide de l'interaction dipolaire, il en résulte un champ rémanent non nul, appelé champ dipolaire moyen. S'il est généralement faible dans le cas d'échantillons polarisés thermiquement (environ 1 Hz pour l'eau pour un champ de 14T à 20°C), il peut s'avérer plus important pour des spins polarisés et concentrés. Ainsi, nous avons mesuré un champ dipolaire moyen jusqu'à 8 Hz, créé par du xénon fortement concentré dans du pentane perdeutéré.

Une faible quantité d'une molécule chimique simple a été dissoute dans le pentane. Il s'agit du trans-2-penténal, dont le proton aldéhydique présente un fin doublet isolé. Sous l'influence de deux champs radiofréquence de même intensité, aux résonances du signal de xénon d'une part, et de celui d'une des raies du doublet de l'autre, le transfert de polarisation du premier vers le second sous l'effet du champ dipolaire créé par le xénon est alors possible. Ce phénomène a été démontré expérimentalement (figure 13), au moyen d'une séquence appelée SPIDER, pour "Spin Polarized InduceD Enhancement by Hartmann-Hahn dipolar Recoupling". Elle consiste à saturer les signaux proton par une succession d'impulsions et de gradients, puis à irradier simultanément les deux types de noyaux sous l'effet des deux champs radiofréquence, et enfin à détecter le spectre proton. Le signal détecté (figure 13C) ne peut être artéfactuel comme l'indiquent d'autres expériences pour lesquelles l'accord de fréquence était imprécis, ou bien lorsque le xénon était dépolarisé (figure 13B). La faible intensité des signaux pourrait résulter d'une adéquation suffisamment bonne des deux champs magnétiques dans une région du tube très réduite, comme tend à le montrer la faible largeur des signaux (1,1 Hz), plus faible que la largeur des mêmes signaux protons d'un spectre 1D classique après optimisation de l'homogénéité du champ magnétique dans l'échantillon (2,1 Hz ; figure 13A). Au prix d'améliorations technologiques, notamment pour rendre comparables les deux champs radiofréquence sur l'ensemble de l'échantillon, cette séquence permettrait d'envisager un gain très important dans la sensibilité des noyaux que l'on ne sait pas polariser autrement, et ainsi de diminuer nettement la limite inférieure de concentration de molécules susceptibles d'être détectées par RMN.

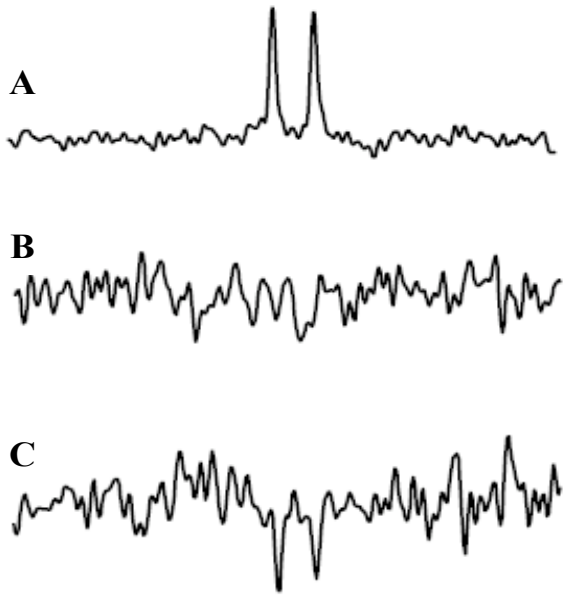


Figure 13: (A) Spectre 1D du proton aldéhydique du trans-2 penténal. (B) exemple de spectre proton selon la séquence SPIDER lorsque le xénon n'est pas fortement polarisé. (C) spectre SPIDER enregistré lors d'une forte polarisation du xénon.

Parmi les nombreuses applications du xénon polarisé dans des domaines touchant la physique, la chimie, la biologie et la médecine, je me suis intéressé à la caractérisation de l'interaction entre le xénon et des solutés, en phase liquide. Ces solutés consistent soit en des protéines, soit en des molécules-cages appelées cryptophanes.

II-D. Caractérisation de cavités hydrophobes de protéines

La fonction biologique des protéines solubles requiert souvent une interaction avec un partenaire moléculaire. En milieu aqueux, certaines ont pour fonction le transport de molécules hydrophobes. Elles possèdent donc pour cela une cavité isolée, ou une simple anfractuosité si elle n'est pas séparée de la surface externe. Des cavités hydrophobes servent aussi à assurer et maintenir la structure tridimensionnelle de protéines. L'utilisation de xénon comme sonde extrinsèque apporte des éléments de caractérisation de certaines de ces cavités. Le xénon représente aussi un partenaire hydrophobe modèle de ces protéines.

Par RMN, l'interaction entre une protéine et du xénon peut être décrite par trois types de paramètres. Ceux ne concernant que le xénon, ou que des noyaux de la protéine, donneront une image du point de vue du gaz rare et de la biomolécule. Enfin, des données d'interaction dipolaire entre les noyaux du xénon et de la protéine fourniront des informations spatiales et dynamiques supplémentaires.

Je me propose de décrire ces trois catégories et de montrer les résultats que nous avons obtenus pour les 4 protéines suivantes étudiées au laboratoire :

- protéine transporteuse de lipide 1 de blé (LTP de blé) [**56**, **57**],
- protéine transporteuse de lipide 1 de *Nicotania tabacum* (LTP de tabac) **[54]**,
- lysozyme de bactériophage T4 comportant 2 mutations C54T et C97A pour s'affranchir de la présence de cystéines, qui aboutiraient par le biais de ponts disulfures inter ou intramoléculaires, à un mélange de protéines (LT4) [**58**],
- Cryptogéine de *Phytophthora cryptogea* (cryptogéine), capable de fortement complexer des stérols [**52**]

II-D-1. Propriétés intrinsèques du xénon

Le spectre ^{129}Xe dissous dans une solution protéique a toujours montré un signal unique (en plus d'un éventuel signal attribué au xénon en phase gaz dans des bulles placées en face des bobines de détection). Ceci résulte de l'échange rapide du xénon entre différents environnements. Les propriétés du signal de xénon (déplacement chimique, T_1, T_2) découlent du temps passé dans chaque environnement qui peuvent être rassemblés comme suit :

- le xénon dans le solvant aqueux, à grande distance de la protéine,
- le xénon à proximité de la surface hydrophile de la protéine, impliquant des interactions dites "non-spécifiques". On peut considérer ces interactions comme un grand nombre de sites de complexation du xénon, avec une constante de complexation très faible.
- le xénon au sein de cavités hydrophobes, à l'origine d'interactions dites "spécifiques". Il s'agit de sites peu nombreux mais avec une constante de complexation plus importante, de l'ordre de 10 à 200 M^{-1}.

Nous allons à présent examiner les différentes caractéristiques du signal RMN du xénon 129 dans les protéines.

a) Déplacement chimique

Le déplacement chimique du signal unique de xénon résulte de la moyenne de son déplacement chimique dans chaque environnement, pondéré par le temps passé dans chacun d'eux. Il s'agit donc d'un paramètre facilement accessible expérimentalement, mais peu spécifique.

Cependant, connaissant la constante de complexation protéine-xénon au moyen d'autres paramètres expérimentaux (voir ci-dessous), la variation du déplacement chimique du xénon en fonction de la

fraction de xénon lié, à une concentration en protéine donnée, on peut en déduire le déplacement chimique du xénon complexé. Pour le LT4, un déplacement de 32,4 ppm vers les champ forts a été mesuré par comparaison au déplacement chimique dans le solvant [**58**]. Rubin et al. [**59**] ont observé que cet écart décroît avec la taille de la cavité de la protéine. Le déplacement chimique permet donc grossièrement d'estimer cette taille dans le cas d'une protéine n'en possédant qu'une.

b) Temps de relaxation longitudinale T_1

Le T_1 du xénon provient des interactions dipolaires avec les spins environnants, en tout premier lieu les protons. Le taux de relaxation mesuré R_1, inverse du T_1, résulte, tout comme le déplacement chimique, d'une moyenne du taux de relaxation pondérée par le temps de résidence du xénon passé dans les différents environnements, selon l'expression bien connue dans l'hypothèse de réorientation isotropiques dans le champ magnétique externe :

$$R_{1\,Xe} = \frac{1}{10}\left(\frac{\mu_0}{4\pi}\right)^2\left(\frac{\hbar\gamma_{Xe}\gamma_H}{r^3}\right)^2\left[\frac{\tau_{dip}}{1+(\omega_{Xe}-\omega_H)^2\tau_{dip}^2}+\frac{3\tau_{dip}}{1+\omega_{Xe}^2\tau_{dip}^2}+\frac{6\tau_{dip}}{1+(\omega_{Xe}+\omega_H)^2\tau_{dip}^2}\right] \quad (6)$$

où ω et γ sont respectivement la pulsation de résonance et le rapport gyromagnétique du noyau considéré, r la distance séparant le xénon et le proton, μ_0 est la perméabilité magnétique du vide et τ_{dip} le temps caractéristique de l'interaction dipolaire entre les deux noyaux.

Cependant, la pondération opère également sur τ_{dip}, car $\tau_{dip}^{-1} = \tau_c^{-1} + \tau_{res}^{-1}$, où τ_c est le temps de réorientation du vecteur Xe-H dans le champ magnétique et τ_{res} le temps de présence du proton à proximité du xénon. Le plus petit de ces deux termes est le prépondérant. Une limite inférieure approximative de τ_{res} est le cas de libre diffusion du xénon dans l'eau, dont la valeur est de l'ordre de 30 ps à température ambiante. Il est cependant possible que le xénon diffuse plus vite près de la surface qu'au sein du solvant. Le temps de réorientation des protéines étudiées est quant à lui d'environ 5 à 10 ns. La figure 14 donne un aperçu du degré de sélectivité qu'apporte le T_1.

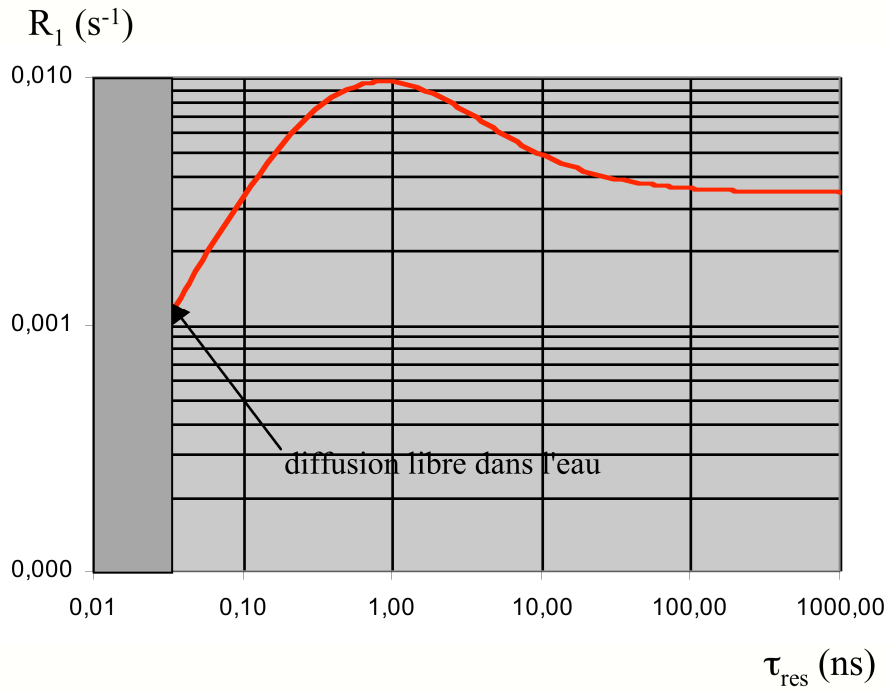


Figure 14: taux de relaxation du xénon par interaction dipolaire avec un proton situé à 3,3 Å, au sein d'une protéine de temps de corrélation de 5 ns, dans un champ magnétique externe de 11,7 T, en fonction du temps de résidence τ_{res} du xénon.

Le xénon relaxe donc beaucoup plus efficacement lorsque sa diffusion est restreinte, comme par exemple au sein d'une cavité. Cette propriété a été mise à profit pour mesurer la constante de complexation du xénon avec la LTP de blé [**57**], au moyen d'un simple modèle de complexation protéine:xénon 1:1, et de l'équation suivante :

$$R_1 = f(R_{1\,\text{spécifique}}) + (1-f)(R_{1\,\text{libre-ns}}) \qquad (7),$$

où f représente la fraction de xénon en interaction spécifique avec la protéine, $R_{1\,\text{spécifique}}$ le taux de relaxation correspondant, et $R_{1\,\text{libre-ns}}$ le taux de relaxation moyenné entre les interactions non spécifiques et libre dans l'eau.

Une constante de complexation de 57 ± 10 M^{-1} a été obtenue à partir des valeurs de T_1 mesurées à plusieurs pressions de xénon et concentration en protéine.

Une valeur de T_1 du xénon complexé peut être déduite, pour chaque champ magnétique extérieur (figure 15). La dépendance du T_1 avec le champ magnétique externe B_0 qui apparaît dans l'expression permet de déduire le temps de corrélation du xénon avec les protons environnants au sein de la cavité. Il a été estimé à 0,4 ns, c'est-à-dire à au moins un ordre de grandeur plus petit que le temps de rotation de cette protéine. Il représente donc une estimation du temps de résidence moyen du xénon à proximité des protons de la cavité de cette protéine. Il apparaît que le xénon saute d'une alvéole à l'autre au sein de la grande cavité, de volume d'environ 300 $Å^3$, que comporte la LTP de blé.

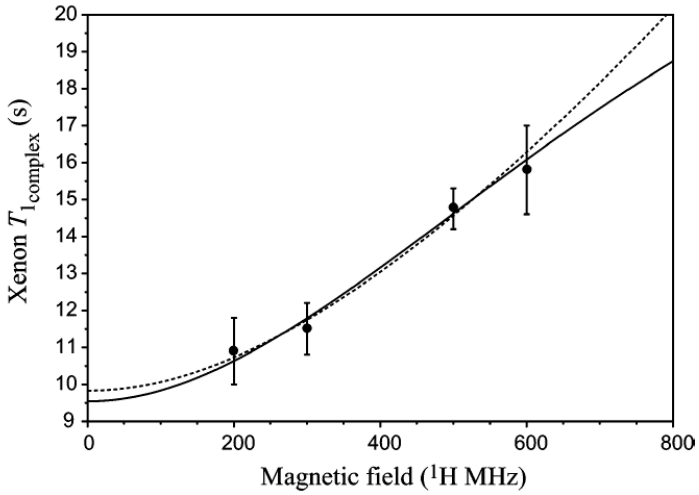


Figure 15: Temps de relaxation longitudinale du xénon complexé dans la LTP de blé en fonction du champ magnétique à 20°C **[57]**. La ligne pointillée suppose une relaxation purement dipolaire xénon-proton. La ligne pleine tient compte des contributions de l'anisotropie de déplacement chimique à la relaxation. Ce mode de relaxation apparaît comme peu efficace au regard de la relaxation dipolaire.

Le temps de corrélation mesuré pour le LT4 est d'environ 0,8 ns, soit le double de la valeur dans la LTP de blé. La cavité de cette protéine est beaucoup plus petite, et la structure cristallographique a révélé que la cavité était plus large lorsqu'un atome de xénon était incorporé. Le xénon complexé peut donc moins facilement se déplacer. Cependant, ce temps de corrélation est encore très court, 12 fois plus faible environ que le temps de rotation de la protéine dans le champ magnétique. Ceci dénote la dynamique inhérente des protéines et en particulier les chaînes latérales bordant des cavités hydrophobes [**60**].

c) Temps de relaxation transversale T_2

La mesure du taux de relaxation transversale R_2, inverse du T_2, du signal d'un noyau hyperpolarisé ne peut être effectuée au moyen d'une classique séquence d'écho de spin, en faisant varier pour chaque spectre la durée de l'écho, car le niveau de polarisation diminue au cours du temps. Sur un spectre ^{129}Xe à une dimension, les largeurs de raie ont deux composantes : l'une est due à diverses inhomogénéités au sein de l'échantillon comme le champ magnétique ou la température, et l'autre aux autres composantes. L'effet des inhomogénéités peut être majorée par la largeur du plus fin des signaux du spectre. Même si les bobines de la sonde RMN, et donc le volume analysé, diffèrent pour

le proton et le xénon, un spectre proton enregistré dans les mêmes conditions donnent une idée de l'homogénéité B_0.

Dans le cas des LTP de blé et de tabac, tout comme pour la cryptogéine, la largeur du signal du xénon ne dépend pas significativement de la fraction de xénon complexé par la protéine. Au contraire, une corrélation linéaire a été observée pour le LT4. R_2 possède alors une composante supplémentaire par rapport à R_1 :

$$R_2 = f\left(R_{2\,\text{spécifique}}\right) + (1-f)\left(R_{2\,\text{libre-ns}}\right) + f(1-f)\left(\gamma_{Xe}\Delta\delta\, B_0\right)^2 \tau_e \qquad \textbf{(8)}$$

$\Delta\delta$ représente la différence de déplacement chimique entre le xénon libre (ou non spécifique) et le xénon complexé, et τ_e le temps de corrélation de l'échange du xénon entre ces deux environnements. τ_e est assimilable au temps de résidence du xénon dans la cavité. Cette expression est valide si le seul temps d'échange suffisamment long pour influencer T_2 est celui d'entrée-sortie du xénon de la cavité. Il suppose donc que la diffusion entre les sites non spécifiques et le solvant est rapide, ce qui est probable, mais surtout que lorsqu'une cavité possède plusieurs alvéoles, comme c'est le cas des LTP, le passage de l'un à l'autre est rapide, à moins que les déplacements chimiques du xénon dans ces alvéoles soient fortuitement très proches. $R_{2\,\text{spécifique}}$ peut être calculé à partir des valeurs de $R_{1\,\text{spécifique}}$ à plusieurs champs magnétiques et apparaît comme négligeable. $R_{2\,\text{libre-ns}}$ étant également très faible, les données expérimentales fournissent une estimation de τ_e de 13 ± 4 μs dans le cas du LT4 [**58**]. Les mesures, réalisées à 2 champs magnétiques, 11,7 et 14,1T, sont en accord entre elles.

Contrairement aux autres protéines, la petite taille de la cavité du LT4 semble donc induire une forte limitation de la vitesse d'entrée-sortie du xénon.

II-D-2. Propriétés RMN de la protéine

Les paramètres RMN du xénon apportent des informations thermodynamiques et cinétiques sur sa complexation dans des cavités de protéines. Cependant, très peu d'informations structurales sont accessibles. Il n'a par ailleurs pas été possible de distinguer le comportement du xénon dans le solvant et à la surface des protéines, impliqué dans des interactions non spécifiques. Les paramètres RMN des noyaux de la protéine viennent compléter cette description.

a) Déplacement chimique

Comme pour le xénon, le déplacement chimique des noyaux de la protéine résulte d'une moyenne de leur déplacement chimique pondérée par le temps passés dans les différents environnements explorés. Pour toutes les protéines, la vitesse d'échange entre ces environnements est rapide à l'échelle du déplacement chimique, même en présence de xénon en solution.

Cependant, les variations des déplacements chimiques avec la pression de xénon, variations spécifiques à certains signaux, montrent que l'environnement de ces noyaux est modifié par la présence de xénon. Ces changements peuvent être dus à une modification structurale moyenne locale de la protéine ou du réseau de liaisons hydrogène du solvant dans lequel baigne la protéine, mais peuvent aussi résulter d'une répartition différente des micro-états de la protéine témoin de son caractère dynamique.

Les variations de déplacement chimique ^1H avec la pression de xénon ont été étudiées sur les 4 protéines, complétées par les variations ^{13}C pour 3 d'entre elles, à l'exception de la LTP de blé, et ^{15}N pour le LT4.

La méthodologie, décrite ici pour la LTP de tabac [**54**], est la suivante. Le déplacement chimique des noyaux de la protéine varie en fonction de la pression de xénon au-dessus de la solution, donc de la concentration de xénon dissous, selon trois comportements :

- les déplacements chimiques de certains signaux suivent une variation non linéaire avec la pression de xénon, comme C_δ L11 ou H_N A67 (figure 16). Ils rendent compte typiquement d'interactions spécifiques avec le xénon. En supposant qu'une seule complexation influe sur le déplacement chimique du noyau de la protéine, celui-ci vérifie :

$$\Delta\delta = \frac{K[Xe]}{1+K[Xe]}\Delta\delta_{complexe} \quad (9)$$

- D'autres signaux, comme H_N N76, répondent linéairement avec la pression de xénon. Ils rendent comptent d'interactions non spécifiques. L'équation régissant cette interaction découle de l'équation précédente en faisant tendre K vers 0, et en remplaçant la variation de déplacement chimique du noyau lors de la complexation totale $\Delta\delta_{complexe}$ par la plus haute valeur observée expérimentalement $\Delta\delta_{max}$:

$$\Delta\delta = K[Xe]\Delta\delta_{max} \quad (10)$$

- Enfin, le déplacement chimique de certains signaux, comme C_γ I77, est indépendant de la pression de xénon, aux erreurs de mesure près. Ceci peut s'expliquer soit par l'absence de variation de la structure autour du noyau considéré, soit par une variation entre deux états fortuitement de même déplacement chimique, soit encore par une modification de l'exploration des micro-états dynamiques donnant, ici aussi par hasard, un même déplacement chimique. Nous verrons plus loin (chapitre II-D-3), que Cγ I77 est dans le second cas de figure. Une absence de variation de déplacement chimique d'un noyau n'est donc pas une preuve suffisante de l'absence de modifications structurales à proximité.

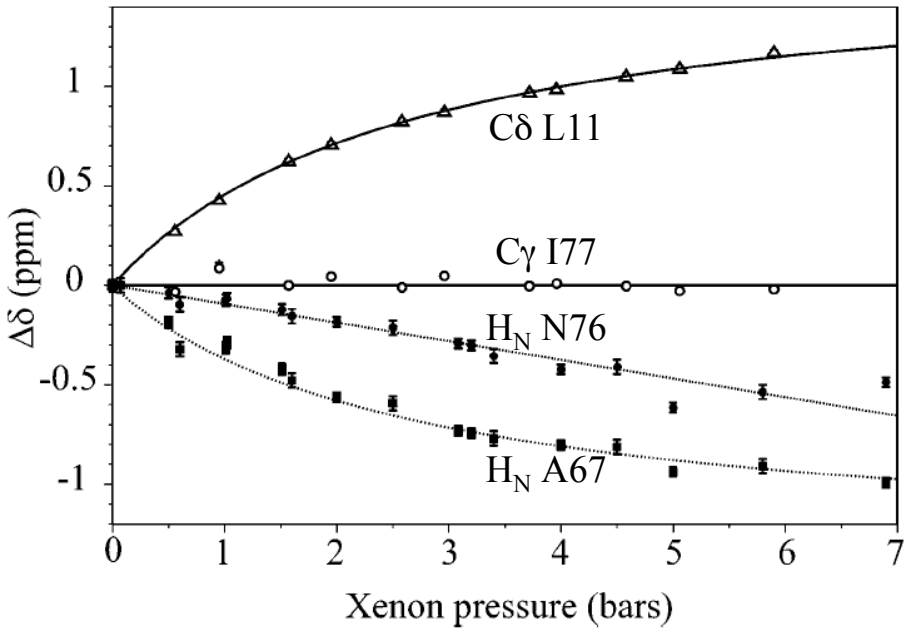


Figure 16: Variation du déplacement chimique Δδ de 4 noyaux de la LTP de tabac **[54]** en fonction de la pression de xénon au-dessus de la solution, en se référant à l'échantillon dégazé. H_N dénote un proton amidique.

Au moyen d'un test statistique, on distingue les noyaux dont la variation de déplacement chimique est mieux décrite, avec 1% de risque d'erreur, par un modèle spécifique que par un modèle non spécifique. Ainsi, pour la LTP de tabac, parmi les 674 signaux de protons et de ^{13}C observés, 42 sont décrits par un modèle spécifique. En comparant la moyenne des erreurs au modèle, avec la moyenne d'erreur de lecture des déplacements chimiques (test du χ^2), on peut même affirmer qu'un modèle faisant intervenir plus de paramètres, impliquant par exemple la complexation de plusieurs atomes de xénon, n'apporterait rien de significatif à la qualité du fit. 36 des 42 noyaux entourent directement la cavité de la protéine, tandis que les 6 restant sont très proches des précédents. A partir des données expérimentales, 42 valeurs de constante de complexation du xénon sont déduites. Elles sont toutes comprises entre 50 et 111 M^{-1}. Même en s'aidant de la structure de la protéine [**61**], il n'a pas été possible de les regrouper. La protéine comportant 4 alvéoles notées A, B, C et D, les constantes mesurées pour les noyaux autour des cavités A, B et C ne sont pas significativement différentes. Elle l'est pour l'alvéole D, mais au vu d'un seul signal. De plus, l'alvéole D est la moins accessible par le

solvant, puisqu'elle ne communique qu'avec C, alors que A, B et C communiquent entre elles. L'accès au solvant est proche de l'alvéole B, donc loin de D. Le xénon serait donc plus complexé avec D du fait de moindres chances de quitter cette alvéole, et non d'interactions stabilisatrices plus grandes. Bien qu'éloignés de la cavité, certains azotes amidiques voient leur déplacement chimique suivre un comportement spécifique. C'est le cas de H_N A67 (figure 16). On peut expliquer ce comportement par des modifications structurales de grandes échelles qui affectent non seulement les atomes bordant la cavité mais aussi ceux situés au-delà. On ne peut plus alors attribuer ce comportement spécifique à une alvéole particulière mais à l'ensemble de la cavité.

La LTP de blé sous 5 bar d'azote montre seulement 2 signaux déplacés de plus de 0,02 ppm par rapport à l'échantillon dégazé, contre 22 pour du xénon. La pression seule ne peut expliquer les variations de déplacement chimique observées. Sous 1 bar de xénon, les seuls deux mêmes signaux sont déplacés de plus de 0,02 ppm. Or, comme la solubilité de l'azote dans l'eau est environ 5 fois moindre que celle du xénon à la même pression, la concentration de gaz hydrophobe dissous est la même sous 5 bar d'azote et 1 bar de xénon. Ceci semble indiquer que la seule présence d'un composé hydrophobe, quel qu'il soit, peut expliquer les interactions observées. Elles pourraient être dues à l'exclusion du réseau de liaisons hydrogène, durant une partie du temps, en proportion de la concentration du gaz dissous et de celle du solvant.

Le cas du LT4 [**58**] est plus compliqué. Un certain nombre de protons, entourant l'unique cavité capable de complexer le xénon, suivent le modèle spécifique et fournissent une constante de complexation de 60 M^{-1}. Cependant, la protéine est composée de deux domaines séparés par une charnière, et deux conformations coexistent, en échange rapide à l'échelle du déplacement chimique des noyaux de la protéine. Ces conformations sont appelées "ouverte" et "fermée". Comme plusieurs protons situées à proximité de cette charnière suivent un modèle spécifique, il apparaît que le xénon influe sur l'équilibre entre ces deux conformations. Cependant, la constante de complexation correspondante ne diffère pas significativement de celle obtenue pour les protons autour de la cavité.

Enfin, concernant la cryptogéine [**52**], une variation significative de déplacement chimique avec la pression de xénon n'a été observée que pour 14 signaux, et le modèle spécifique n'est significativement meilleur pour aucun d'eux. Une valeur supérieure de 20 M^{-1} pour la constante de complexation en est déduite.

b) Temps de relaxation transversale T_2

Comme nous l'avons déjà vu (équation 8), le temps de relaxation transversale T_2 d'un noyau est sensible à la variation de son déplacement chimique $\Delta\delta$, variation liée à la présence de plusieurs environnements, pour peu qu'elle ne soit pas trop différente de la vitesse d'échange $k_e = 1/\tau_e$ du noyau entre ces environnements. Il s'agit du terme $f(1-f)(\gamma\,\Delta\delta\,B_0)^2\tau_e$. Inversement, connaissant les déplacements chimiques de chaque environnement et leur taux d'occupation respectifs, et dans le cas d'un échange rapide devant la différence de déplacement chimique, l'absence d'augmentation du T_2 implique une limite inférieure pour la vitesse d'échange.

Dans la cas de la LTP de tabac, parmi les 42 signaux dont le déplacement chimique a été reconnu comme répondant à la complexation spécifique par le xénon, aucun ne montre d'élargissement notable en fonction de la pression de xénon. La différence de fréquence de résonance maximale observée étant de 1.17 ppm, soit 146 Hz à 11,7 T, pour C_δ L11 (figure 16), et comme un élargissement de plus de 3 Hz serait facilement observable, on en déduit que la vitesse d'échange du xénon dans l'alvéole la plus proche de cet atome est supérieure à 70 kHz. Ainsi, on démontre que la vitesse d'échange globale du xénon entre l'alvéole A et les autres sites, c'est-à-dire les autres alvéoles et le solvant, est supérieure à 70 kHz. La mesure précise, par CPMG [**62**] du T_2 des azotes 15 a permis de donner une limite inférieure à la vitesse d'entrée-sortie du xénon dans la cavité de la LTP de tabac. Bien que la variation de fréquence de résonance de N_HA67 (65 Hz) soit inférieure à celle du C_δ L11, la précision de la mesure (0,8 Hz) a permis d'obtenir une limite inférieure de vitesse de 50 kHz cohérente avec la valeur obtenue en ^{13}C. Combinées avec la valeur du temps de corrélation du xénon dans la cavité de blé (0,4 ns), on peut décrire plus précisément le comportement du xénon dans la cavité : il passe d'une alvéole à l'autre à une échelle de l'ordre de la nanoseconde, et il entre et sort de la cavité dans son ensemble à une échelle de temps de l'ordre de 10 μs ou moins.

Le cas du LT4 [**58**] est différent. Alors que la vitesse d'entrée-sortie du xénon dans la cavité de la protéine est de l'ordre de 13 μs (voir ci-dessus), la vitesse d'ouverture-fermeture de la protéine au niveau de la charnière a été mesurée pour le mutant L99A de la protéine à environ 625 μs. Pour vérifier cette valeur pour le LT4 non muté (hormis les cystéines libres), une expérience de ROESY hors-résonance [**63**] a été menée à 18,8 T. Le principe consiste à mesurer la relaxation nucléaire en présence d'un champ magnétique B_1 dont on fait varier d'une part la durée, et d'autre part le rapport entre son intensité ω_1 et l'écart entre sa fréquence et la fréquence de résonance du noyau considéré $\Delta\omega$ (figure 17). On note θ l'angle tel que ce rapport vaille tan θ. La densité spectrale responsable de la relaxation extraite peut couvrir la gamme 10^2 - 10^7 Hz. De là, au moyen de modèles, on déduit la fréquence des changements d'environnement du noyau dans ces échelles de temps, qui traduisent un mouvement moléculaire. Dans le cas présent, l'étude a porté sur le signal proton du methyle δ de la L121. Il est ressorti de cette expérience que ce méthyle subissait un changement d'environnement avec un temps de corrélation de 155 ± 25 μs, soit très significativement plus que le temps de corrélation observé sur le xénon (13 ± 4 μs). En effet, les temps caractéristiques observés ne correspondent pas au même phénomène physique. Alors que le temps de corrélation du xénon est lié à son entrée-sortie de la cavité, il s'ajoute pour le méthyle de la L121 une vitesse d'échange entre les deux conformations "ouverte" et "fermée" de la protéine. En fait, il apparaît que le xénon peut atteindre la cavité indépendamment de la conformation de la protéine, alors que, pour le mutant L99A, il avait été suggéré que la complexation de petits composés organiques benzéniques était couplée à la vitesse de conversion entre les conformations "ouvert" et "fermé" [**64**].

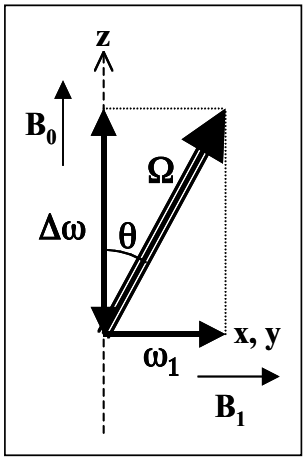


Figure 17: Définition de l'angle θ et du champ magnétique effectif Ω. Δω est la différence entre la fréquence de résonance des protons et la fréquence d'application du champ B_1, d'intensité ω_1/γ.

II-D-3. Propriétés impliquant le xénon et la protéine : interactions dipolaires croisées observées par SPINOE

L'influence de la concentration de xénon dissous sur le déplacement chimique de noyaux de la protéine donne des indications peu précises sur la localisation du xénon complexé. Dans certains cas, comme décrit précédemment pour un méthyle de L121 du LT4, les variations de déplacement chimique observées ne sont pas uniquement due à la complexation du gaz rare. Pour s'assurer de la localisation du xénon, nous avons employé la séquence SPINOE (voir III-C).

Les méthodologies employées pour les 4 protéines sont très similaires. Un spectre SPINOE est enregistré à un temps de mélange d'environ 500 ms, suffisamment long pour que le rapport signal sur bruit soit acceptable, mais assez court pour que la diffusion de spin entre protons reste une aide à l'attribution et non une perte de précision spatiale. Pour améliorer encore la sensibilité, plusieurs spectres ont parfois été additionnés. L'attribution directe de l'ensemble du spectre monodimensionnel SPINOE d'une protéine, qui comporte potentiellement de l'ordre d'un millier de signaux, même en solvant deutéré, est généralement impossible. Ainsi, le spectre SPINOE de la cryptogéine (figure 18) permet l'attribution non ambiguë de certains signaux aromatiques isolés, mais pas des protons aliphatiques, notamment les protons caractéristiques des chaînes latérales hydrophobes, entre 0 et 2,5 ppm environ. On a alors recours à une stratégie qui implique la connaissance de la structure tridimensionnelle de la protéine.

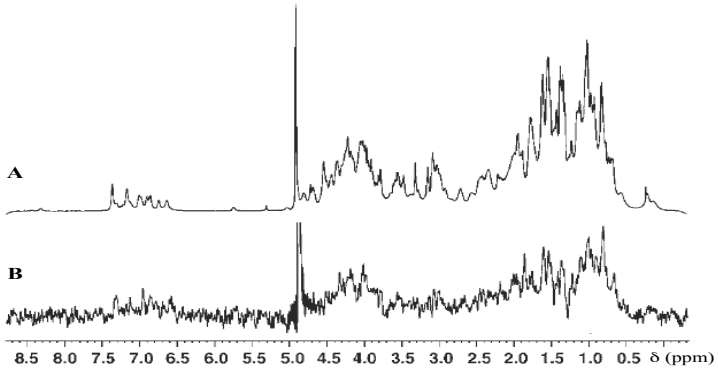


Figure 18: A) spectre 1D de la cryptogéine dans D_2O. B) spectre SPINOE résultant de la somme de 3 expériences, avec un temps de mélange de 300, 500 et 700 ms [**52**].

Dans le cas de la cryptogéine **[**52**]**, le spectre SPINOE a été découpé en 26 zones contenant manifestement un signal isolé ou plusieurs de fréquence très proches. De l'ensemble des déplacements chimiques des protons obtenus dans les mêmes conditions à partir de spectres homonucléaires classiques TOCSY et NOESY, ont été extraits les 515 protons (ou groupes de protons équivalents magnétiquement, comme les méthyles) résonant dans ces zones. Comme la diffusion de spin proton-proton est hautement probable, n'ont été retenus que les 86 protons dont la majorité des voisins à moins de 4 Å se trouvent aussi dans une des 26 zones. Parmi eux, les 52 protons situés à moins de 4 Å de la cavité hydrophobe de la protéine et leurs voisins suffisent à expliquer les 26 zones SPINOE. La position sur la structure tridimensionnelle en solution de la protéine [**65**] de ces protons indique que le xénon interagit non seulement au niveau de la cavité mais aussi dans le canal hydrophobe reliant la cavité à la surface de la protéine (figure 19). Pour la cryptogéine, les paramètres RMN propres au xénon ou à la protéine n'ont pas apporté d'indices déterminants de la complexation du xénon au sein de la cavité hydrophobe. Le spectre SPINOE a apporté cette preuve.

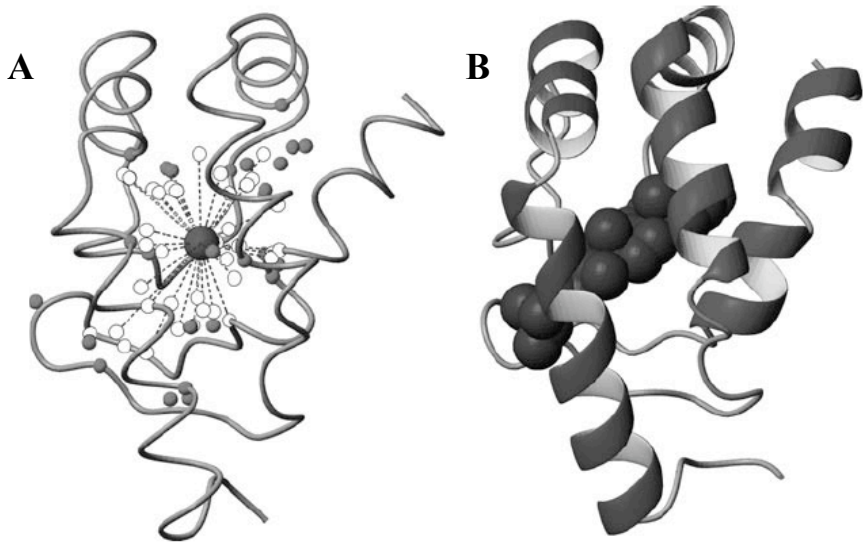


Figure 19: **A)** Représentation sous forme de tube de la cryptogéine [**52**]. La sphère centrale représente le xénon au sein de la cavité, entouré des carbones portant les protons en interaction SPINOE directe avec le xénon (sphères blanches) et probablement due à la diffusion de spin (sphères grises). **B)** structure cristallographique sous forme ruban de la cryptogéine complexée par l'ergostérol (sphères noires), dans la même orientation [**66**]. On remarque la bonne adéquation entre la position des atomes en interaction avec le xénon d'une part, et le stérol d'autre part.

Les spectres SPINOE des LTP de blé et de tabac sont également de sensibilité suffisante pour permettre l'attribution des spectres. Il apparaît que les signaux observés correspondent à des protons entourant toutes les alvéoles formant la cavité de chaque protéine. On observe en particulier un fort SPINOE avec le C_γ I77 de la LTP de tabac, alors qu'aucune variation de déplacement chimique avec la pression de xénon n'avait été observée (figure 16). Ce signal SPINOE indique que ce méthyle est proche du xénon.

Pour le LT4, le comportement est totalement différent. Bien que la complexation du xénon soit démontrée par plusieurs paramètres RMN propres au xénon et aux noyaux de la protéine (voir paragraphes précédents), le spectre SPINOE montre un rapport signal sur bruit beaucoup plus faible, et seuls 19 protons de 11 acides aminés ont été attribués, entourant tous la cavité.

Ces différences de sensibilité du spectre SPINOE procurent des informations sur la dynamique du xénon dans les différentes cavités. Ainsi, le temps de corrélation xénon-proton observé dans la LTP de blé est de 0,4 ns. Ce temps de corrélation est optimal pour le transfert SPINOE, comme on peut le voir sur la figure 11. Il est d'environ 0,8 ns pour le LT4. L'efficacité du transfert de polarisation est donc moins favorable (figure 11, droite). De plus, comme le LT4 est presque deux fois plus gros que les LTP, le temps de corrélation rotationnel global de la protéine augmente dans les mêmes proportions. Par conséquent, la vitesse de relaxation longitudinale due aux interactions dipolaires proton-proton est plus élevée, augmentant la diffusion de spin, ce qui répartit les signaux SPINOE. Enfin, la cavité du LT4 est assez petite et sa taille doit légèrement augmenter pour accueillir un atome de xénon. On peut donc concevoir que lors de la complexation, les chaînes latérales hydrophobes sont beaucoup moins mobiles que dans la grande cavité à plusieurs alvéoles déformables des LTP. Les temps de corrélation proton-proton au sein, ou entre, ces chaînes latérales hydrophobes sont donc certainement plus courts pour les LTP que pour le LT4.

Le cas de la cryptogéine se révèle encore différent. La cavité est de très grande taille et comporte des acides aminés inhabituels, comme des tyrosines et phénylalanines. La bonne sensibilité du SPINOE et l'absence de variations de déplacement chimique amènent à la conclusion que la cavité et le canal sont entièrement explorés par le xénon, avec un temps de résidence en chaque endroit de l'ordre de 0,1 à 1 ns, sans pour autant affecter significativement la dynamique des chaînes latérales voisines.

La méthodologie déployée a permis de montrer des différences fondamentales d'interactions xénon-protéine pour les exemples étudiés, si l'on excepte les deux LTP au comportement similaire. Ces différences apparaissent sur le plan structural et surtout dynamique. La structure s'obtient fréquemment plus facilement par cristallographie aux rayons X qu'en RMN, à la condition évidente que la protéine cristallise. En plaçant le cristal dans des conditions de fortes pressions de xénon, il est également possible de localiser ce dernier dans les cavités hydrophobes. En revanche, la cristallographie apporte peu d'informations dynamiques, mis à part le facteur B, généralement interprété comme une mesure de la fluctuation de l'atome correspondant. La RMN apparaît ici capable de préciser bien des aspects thermodynamiques (constantes de complexation) et cinétiques (vitesse de complexation du xénon, mobilité du xénon dans les cavités, mobilité des chaînes latérales) et ce même à des pressions proches de la pression atmosphérique. Ainsi, cette étude s'inscrit dans une recherche de progrès dans la compréhension des interactions entre des protéines et des partenaires hydrophobes, physiologiques ou non.

II-E. Complexation du xénon par des cryptophanes

Les cavités hydrophobes de protéines sont généralement bordées de chaînes latérales flexibles qui compliquent la compréhension des mécanismes de complexation et de stabilisation de molécules hydrophobes. Malgré l'absence de degré de liberté interne au xénon permettant de s'affranchir d'un terme entropique, contrairement aux molécules polyatomiques, la problématique reste trop compliquée pour pouvoir expliquer, et de là prédire, les données quantitatives sur la thermodynamique et la cinétique d'interaction protéine-gaz rare observée. La collaboration scientifique initiée au laboratoire avec les Drs. Dutasta et Brotin, de l'ENS de Lyon, donne l'opportunité d'avancer vers une meilleure compréhension de ces interactions au travers de systèmes plus simples et plus rigides tels que les cryptophanes. Ces molécules-cages ont la propriété intéressante de pouvoir très fortement complexer un atome de xénon et un seul, du moins pour les cryptophanes de petite cavité étudiés ici. On observe alors le plus souvent deux signaux RMN du ^{129}Xe en échange lent, l'un caractéristique du xénon dans le solvant, l'autre dans la cavité du cryptophane. De par la grande sensibilité du déplacement chimique du ^{129}Xe et la possibilité de polariser fortement ses spins nucléaires, des applications biologiques et médicales peuvent être envisagées. Par exemple, un cryptophane porteur d'un substituant capable de fortement et spécifiquement complexer une cible choisie pourrait permettre de réaliser l'imagerie de distribution spatiale de cette cible. Ces deux axes expliquent l'effort de recherche engagé ces dernières années.

Les cryptophanes, synthétisés pour la première fois en 1985 [**67**], sont des molécules capables de fortement complexer des molécules neutres [**68**]. Leur structure comporte deux cyclotrivératrylènes (CTVs) reliés par des ponts alkylènedioxy comportant un nombre variable de CH_2, au moins égal à 2 (figure 20). Chaque CTV contient 3 cycles aromatiques substitués, à l'origine par des groupements méthoxy, le rendant ainsi soluble dans des milieux organiques. Depuis, d'autres substituants ont été greffés, comme le camphanate, dont la fonction est d'entièrement dissymétriser la molécule, ou comme des fonctions acides, permettant la solubilisation en milieu aqueux. Le tableau 1 regroupe l'ensemble des cryptophanes étudiés jusqu'à présent au laboratoire.

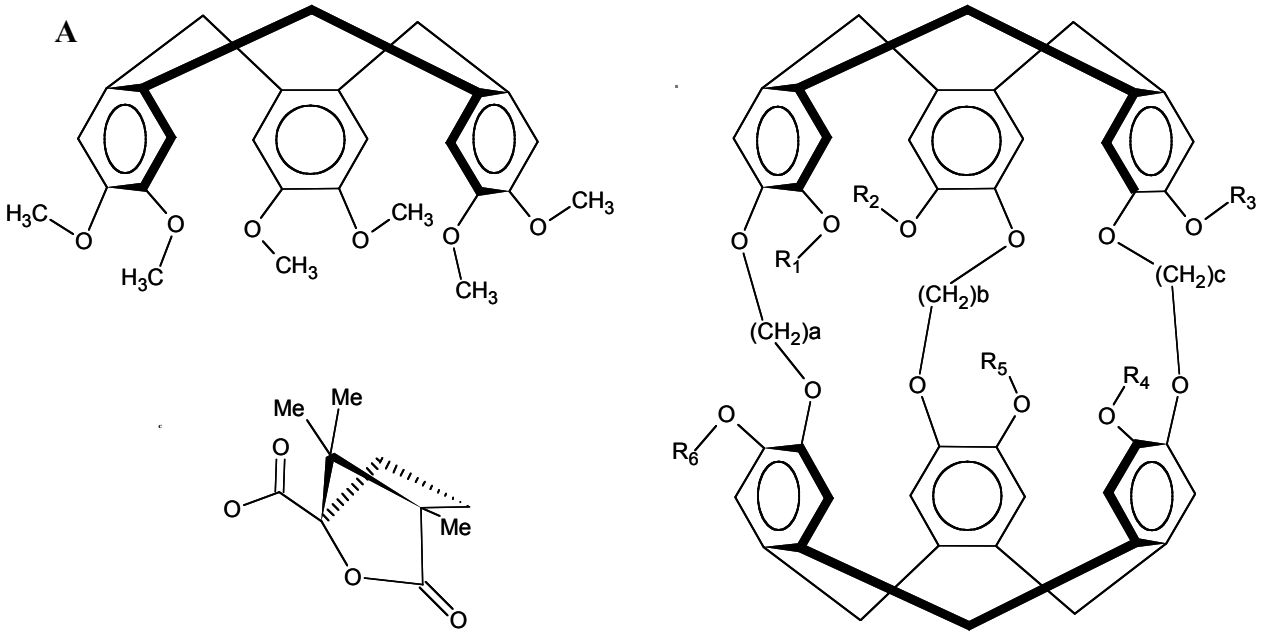


Figure 20: **A)** Structure du cyclotrivératrylène. **B)** Structure générique des cryptophanes abordés dans ce manuscrit. D'autres cryptophanes ont été synthétisés, comme par exemple des cryptophanes avec un lien "syn", et non "anti" entre les deux CTV, c'est-à-dire pour lesquels les groupements OR_i se feraient face par paire. La nomenclature utilisée dans ce rapport est précisée dans le tableau 1. **C)** Structure du camphanate (-)

Nomenclature de ce rapport	Nom complet	Longueur des chaînes			Substituants		Symétrie
		a	b	c	R_1 à R_5	R_6	
A	Cryptophane-A	2	2	2	CH_3	CH_3	D_3
2	Cryptophane-223	2	2	3	CH_3	CH_3	C_2
3	Cryptophane-233	2	3	3	CH_3	CH_3	C_2
E	Cryptophane-E	3	3	3	CH_3	CH_3	D_3
(+)		2	2	2	CH_3	Camphanate (-)	E
(-)		2	2	2	CH_3	Camphanate (-)	E
Ah	Cryptophane-A hydrosoluble [1]	2	2	2	CH_2COO^-	CH_2COO^-	D_3
2h	Cryptophane-233 hydrosoluble [1]	2	2	3	CH_2COO^-	CH_2COO^-	C_2
3h	Cryptophane-223 hydrosoluble [1]	2	3	3	CH_2COO^-	CH_2COO^-	C_2
Eh	Cryptophane-E hydrosoluble [1]	3	3	3	CH_2COO^-	CH_2COO^-	D_3
Ahd	Cryptophane-A hydrosoluble partiellement deutéré [1]	2 *	2 *	2 *	CD_2COO^-	CD_2COO^-	D_3

Tableau 1 : Cryptophanes étudiés au laboratoire. Les colonnes correspondent respectivement à la nomenclature adoptée dans ce rapport, au nom complet de la molécule (1: nom non officiel), à la longueur des chaînes reliant les deux CTV aux substituants de chaque aromatique (voir figure 20 pour leur position exacte). Enfin, la dernière colonne montre la symétrie des molécules. D_3 correspond à la symétrie la plus élevée, suivie de C_2. E correspond à aucun élément de symétrie. Le CTV est de symétrie C_{3v}. **(+)** et **(-)** rendent compte de la configuration absolue de la partie cryptophane de la molécule. La structure de **(+)** et **(-)** est montrée figure 24. * : les chaînes a, b et c sont deutérés pour **Ahd**.

L'étude des interactions cryptophanes-xénon a débuté en 1998 par la caractérisation thermodynamique et cinétique de la complexation du xénon par le cryptophane **A** [**69**]. Le déplacement chimique du xénon décroît dans la série **A**, **2**, **3** et **E** (68, 60, 47 et 30 ppm respectivement) [**70**], se rapprochant de celui observé en phase gaz. Une approche théorique a rationalisé cette observation en montrant que le paramètre fondamental est la taille de la cavité. A mesure que son volume augmente, le xénon est en moyenne de plus en plus éloigné des atomes alentours [**71**]. Nous avons observé le même type de variation dans la série **Ah**, **2h**, **3h** et **Eh** (64, 52, 42 et 35 ppm, figure 21, [**72**]). Le déplacement chimique du xénon est si sensible à son environnement qu'une variation est observée en fonction du taux de deutération de cryptophanes **A** [**73**, **74**]. La vitesse de transfert de xénon directement d'une cage à une est négligeable devant le transfert entre une cage et le solvant [**73**]. La grande sensibilité de la fréquence de résonance du xénon a aussi permis de discriminer les deux énantiomères de **A** dans un milieu chiral [**75**], ou encore de distinguer le xénon dans deux cages **A** dont l'une est protonée et l'autre partiellement deutérée, et reliées par un pont $O\text{-}(CH_2)_{11}\text{-}O$ [**76**]. La substitution d'un méthoxy par un camphanate, dans les molécules **(+)** et **(-)** (voir la figure 24 pour la structure) montre également la grande sensibilité du déplacement chimique du xénon à son environnement [**77**].

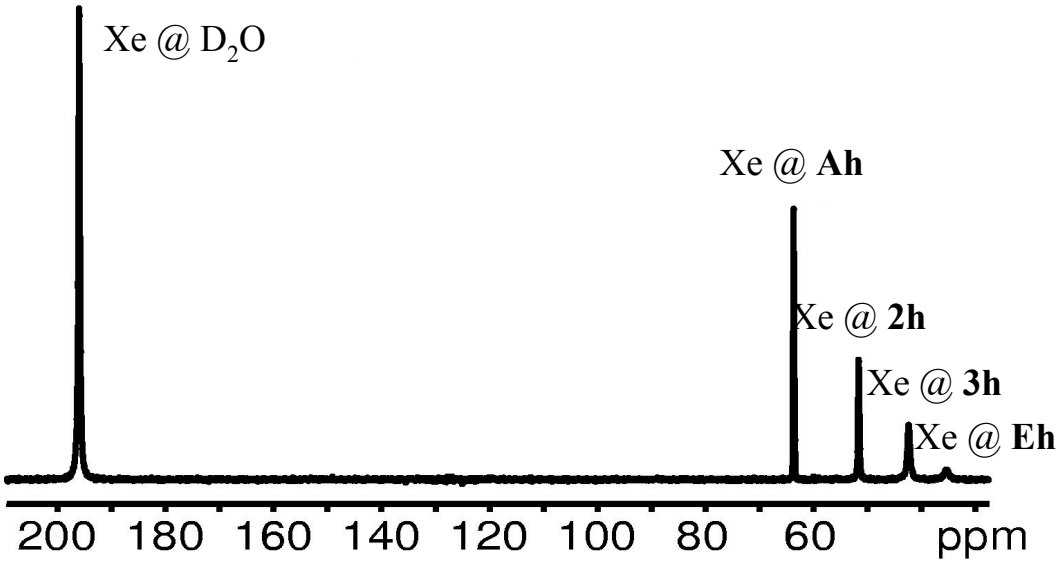


Figure 21: Spectre ^{129}Xe d'un mélange de cryptophanes hydrosolubles, concentration 0.5 à 0.74 mM, dans D_2O, 289K, pour un champ de 11,7T, et sous 1 bar de pression de xénon naturel polarisé par laser.

Les interactions SPINOE entre les protons de **A** et le xénon ont permis de localiser la position moyenne du xénon dans la cavité mais surtout de préciser la conformation exacte des ponts $O\text{-}CH_2\text{-}CH_2\text{-}O$ (ethylènedioxy) de la molécule complexée [**78**]. Récemment, Pines et ses collaborateurs ont montré que le déplacement chimique du xénon dans un dérivé du cryptophane **A** lié de manière covalente à un ligand (biotine) était sensible à la complexation de ce ligand à une protéine cible (avidine), malgré l'éloignement de la modification de l'environnement du xénon. Les auteurs ont alors proposé que l'imagerie résolue en déplacement chimique du xénon 129 polarisé, caractéristique de la complexation, pourrait permettre de réaliser une biosonde, c'est-à-dire à la localisation dans un organisme vivant, hétérogène, de la cible complexée par le ligand [**79**, **80**]. La diversité des articles de revue évoquant la complexation cryptophane-xénon montre le large intérêt du sujet : les complexes supramoléculaires observés par RMN [**81**], la RMN de gaz polarisés et ses applications de la physique à la biologie [**82**, **83**], ou encore l'encapsulation des gaz [**84**].

II-E-1. Structure et dynamique des cryptophanes complexés en solution

Comme nous l'avions remarqué lors de l'étude de complexation de protéines, une preuve de l'inclusion du xénon dans des cavités de cryptophanes est fourni par des spectres SPINOE (voir paragraphe III-C).

La figure 22 montre par exemple un spectre SPINOE d'un mélange de cryptophanes **(+)** et de **(-)** (structure figure 24). On observe clairement sur le spectre que seuls les signaux caractéristiques de la partie cryptophane de la molécule, déplacements chimiques supérieurs à 3 ppm, sont observés en SPINOE. Les signaux attribués au camphanate (encadré C de la figure 24), entre 1 et 3 ppm, n'apparaissent que très faiblement. Ceci confirme l'incapacité du camphanate à complexer le xénon. Ce dernier est au contraire stabilisé au sein de la cage du cryptophane, comme en témoignent les signaux SPINOE des protons correspondants, entre 3 et 7 ppm.

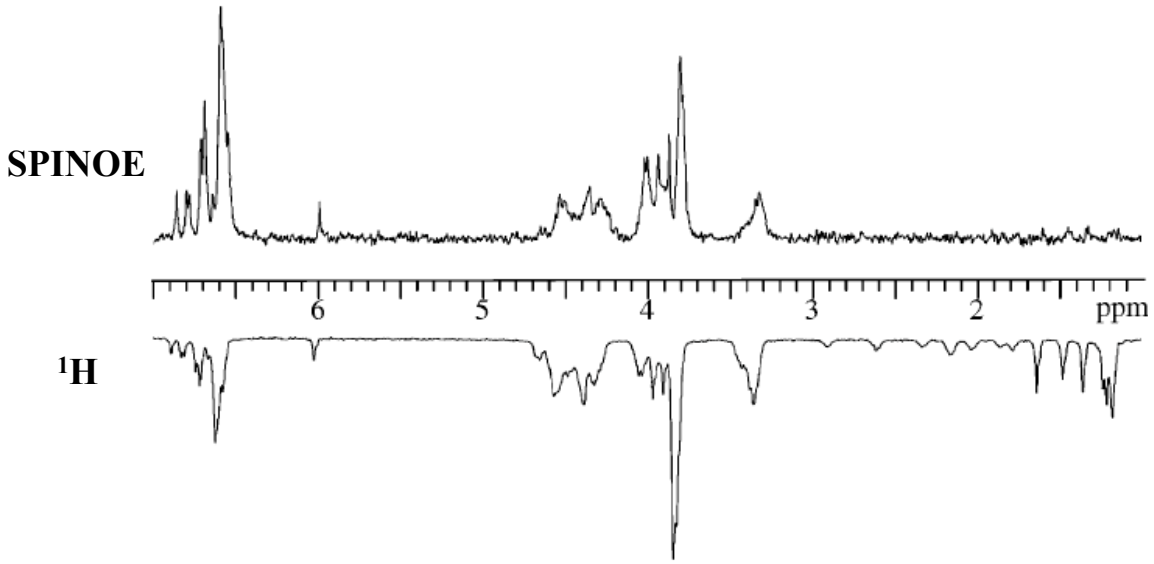


Figure 22: Spectre SPINOE (en haut) et proton (en bas) d'un mélange presque racémique de **(+)** et **(-)** à 288K, 11,7T, dans le 1,1,2,2-tétrachloroéthane. Temps de mélange 500 ms. Le signal du solvant est à 6 ppm.

Localisation du xénon dans la cavité par SPIROE

La séquence SPINOE s'est révélée adéquate pour montrer que le xénon est complexé par le cryptophane **A** et ses dérivés substitués **(+)** et **(-)**. Pour préciser sa localisation moyenne, cette séquence peut en effet suffire dans des cas simples comme **A** [78], ou lorsque la relaxation croisée proton-proton est très faible, comme lors de la complexation de l'α-cyclodextrine par le xénon à 25°C [**45**]. Pour des cryptophanes moins symétriques et avec un temps de corrélation moins favorable, la séquence SPINOE n'empêche pas la diffusion de spin proton-proton. La séquence SPIROE a été développée pour surmonter cette difficulté dans le cas de longs temps de corrélation τ_c [**85**]. Elle dérive du SPINOE par l'introduction durant le temps de mélange d'une irradiation proton radiofréquence telle que celle utilisée pour la séquence ROESY hors-résonance (Cf. III-C-b). Pour des temps de corrélation τ_c longs devant $(2\pi\nu)^{-1}$, ν étant la fréquence de résonance proton, l'angle θ d'annulation de la relaxation croisée (Cf. figure 17) tend vers 35,3° et ne dépend pas de la valeur exacte de τ_c. Dans ces conditions, toute diffusion de spin est sinon annulée, du moins très fortement limitée. Le SPIROE a été testé sur le cryptophane **3** à une température de –4.5 °C, température à laquelle τ_c peut être considéré comme suffisamment long.

Le spectre obtenu (figure 23) montre effectivement un plus faible nombre de signaux de protons en interaction avec le xénon. Seuls les protons en interaction directe avec le xénon sont observées. Alors que tous les signaux proton de **3** sont visibles sur le SPINOE, seuls ceux correspondant aux aromatiques et au lien ethylenedioxy sont observés sur le SPIROE. Ceci indique que le xénon se positionne préférentiellement au sein de chaque CTV et non au centre de la cage. Ainsi, les interactions stabilisatrices de London du xénon avec les aromatiques sont les plus importantes. Plus précisément, le xénon se place du coté du lien alkylènedioxy le plus court, O-CH_2-CH_2-O, ce qui peut s'interpréter là encore par une stabilisation supplémentaire du xénon par des interactions avec les aromatiques de l'autre CTV. Il faut cependant garder en mémoire que les interactions dipolaires proton-xénon sont maximales lorsque $(\omega_H + \omega_{Xe})\tau_c \sim 1$, c'est-à-dire $\tau_c \sim 0{,}4$ ns. Cette valeur dérive à la fois de la rotation du cryptophane en solution, du temps de résidence du xénon à proximité d'un proton donné, mais aussi de la mobilité interne des brins alkylènedioxy. L'interprétation des données doit donc tenir compte des dynamiques différentes des diverses régions de la cavité. Le xénon est aussi en mesure d'explorer la cavité du coté des brins O-CH_2-CH_2-CH_2-O, mais la durée durant laquelle l'interaction dipolaire du xénon avec chaque proton est inférieure à 0,4 ns.

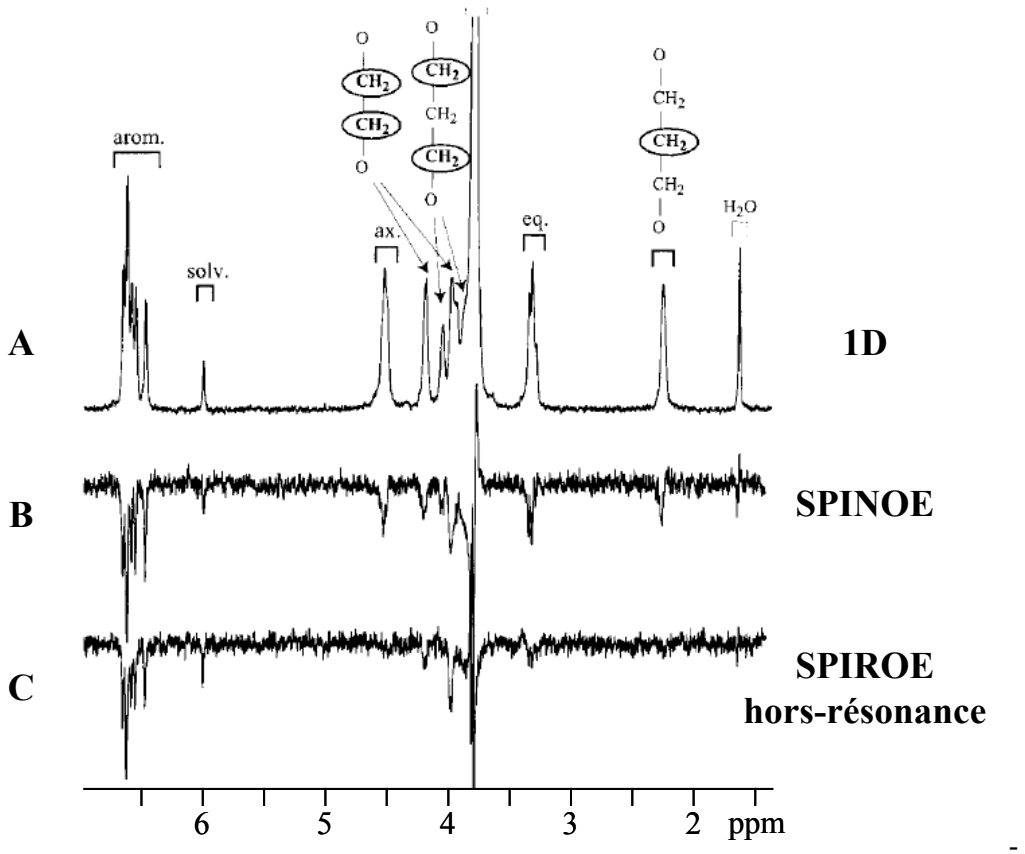


Figure 23: **A)** Spectre proton du cryptophane **3**, avec l'attribution des signaux. **B)** Spectre SPINOE, avec un temps de mélange 500 ms. **C)** Spectre SPIROE, avec le même temps de mélange. Conditions expérimentales : 11,7T, -4.5°C [**85**].

SPIROE-TOCSY : spectre bidimensionnel facilitant l'attribution des signaux SPIROE

Une étude similaire à celle opérée sur le cryptophane **3** a été menée sur **(+)**, un cryptophane **A** monosubstitué par un substituant chiral (figure 24). La molécule ne possède plus d'éléments de symétrie susceptible de rendre équivalents différents noyaux de la molécule. Le nombre de signaux sur le spectre proton devient alors trop important pour attribuer entièrement un spectre SPINOE ou SPIROE monodimensionnel. Pour résoudre ce problème, j'ai déjà décrit une méthode, fondée sur la recherche de protons voisins en interaction avec le xénon, et appliquée aux protéines. Ici, nous avons proposé une approche fondée sur l'enregistrement d'un spectre bidimensionnel [**86**]. De tels spectres sont généralement fondés sur le principe que le système de spins retourne dans le même état avant chaque édition de la séquence. Ceci est important pour enregistrer le spectre dans les mêmes conditions à chaque incrémentation des délais qui permettent, après transformée de Fourier, d'éditer le spectre sur la dimension fréquentielle indirecte. Ceci ne peut être vérifié pour un système en état hyperpolarisé, puisque le taux de polarisation décroît inexorablement au cours de l'expérience. La séquence SPIROE, augmentée d'un délai d'édition des fréquences dans une dimension indirecte et d'une durée de mélange de type TOCSY, avant l'acquisition du signal dans la dimension directe, a dû être optimisée, notamment en ce qui concerne les délais et les temps de mélange.

Comme prévu, le spectre obtenu montre que le xénon se trouve dans la cavité, puisque les seuls signaux en absorption concernent la partie cryptophane de la molécule. Les signaux de la partie camphanate, à champ fort, apparaissent en dispersion, tout comme les signaux des groupements méthoxy. Ces protons ne subissent donc pas de relaxation croisée avec le xénon, mais résulte de l'instabilité de l'échantillon et du spectromètre durant l'expérience, qui est fondamentalement une expérience de différence entre deux spectres, comme toute séquence SPINOE. Le résultat le plus

intéressant concerne la réponse des signaux des méthylènes liant les aromatiques dans chaque CTV. Le proton pointant vers le centre du CTV, Ha sur la figure 25, résonne entre 4,4 et 4,7 ppm, selon le pont méthylénique concerné, alors que le proton pointant vers l'extérieur de la cavité, He, résonne vers 3,4 ppm. Les pics diagonaux de Ha et He ne sont pas visibles mais il apparaît clairement une corrélation en absorption de Ha, sur la fréquence indirecte, vers He sur la fréquence directe. La corrélation symétrique est quant-à-elle très faible et en dispersion. Ceci indique que dans le cas présent, les protons Ha (certains d'entre eux du moins, la sensibilité et la résolution de l'expérience n'étant pas suffisantes pour les différencier) subissent une relaxation croisée de la part du xénon durant la partie SPIROE de la séquence. Après une période d'édition fréquentielle dans la dimension indirecte, l'aimantation Ha est entièrement transférée sur He, de par le choix particulier de la durée du temps de mélange TOCSY.

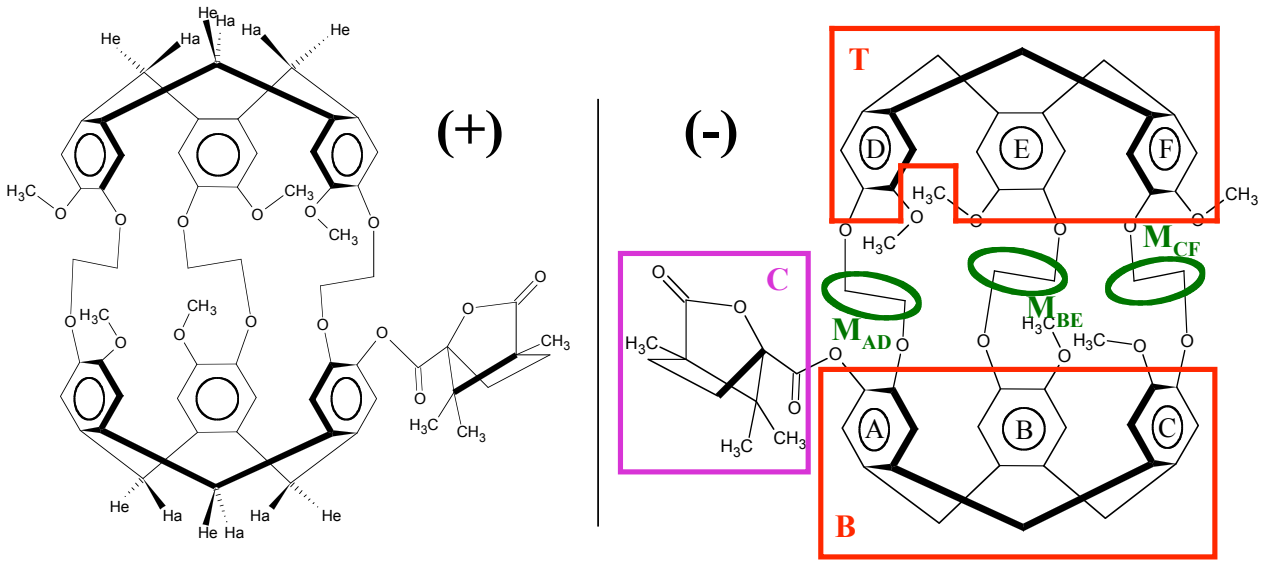


Figure 24: Structure des cryptophanes **(+)** et **(-)**. Les protons Ha et He sont explicités représentés sur **(+)**. La définition des 6 classes de protons est définie pour **(-)**.

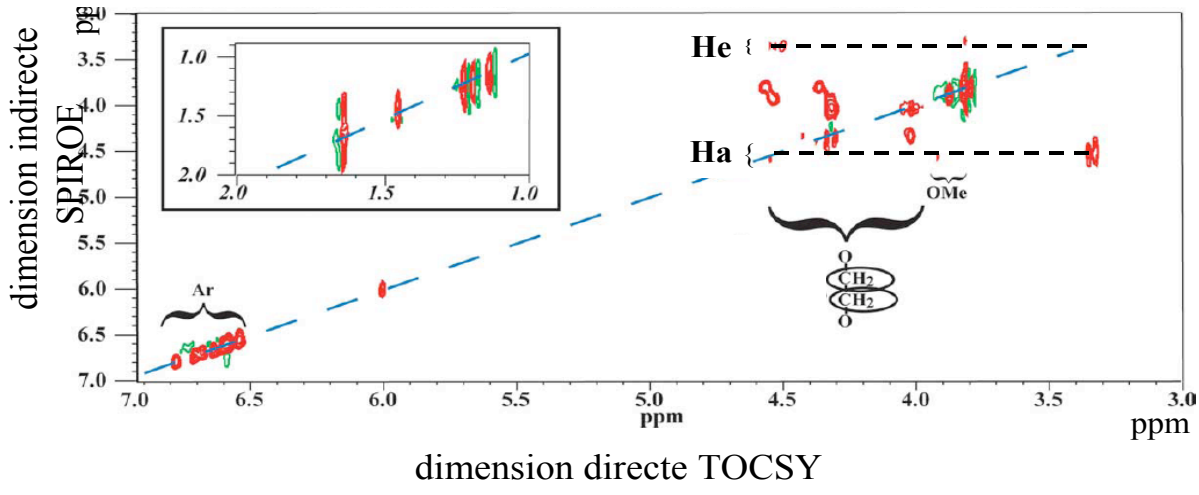


Figure 25: Spectre SPIROE-TOCSY de **(+)** dans d2-1,1,2,2-tétrachloroéthane à –3°C, 0,9 atm de xénon, avec un temps de mélange SPIROE de 290 ms, un angle θ = 32°, et un temps de mélange TOCSY (de type DIPSI) de 25 ms.

Cryptophanes organiques optiquement actifs monosubstitués

Comme nous l'avons déjà remarqué à maintes reprises, l'intensité de corrélations dipolaires xénon-proton dépend non seulement du taux de présence du gaz rare à proximité du proton, de la distance entre les deux noyaux, mais aussi et surtout de leur dynamique relative dans le champ magnétique. Pour mieux comprendre la dynamique des cryptophanes en solution complexés par du xénon, nous avons étudié l'influence du camphanate sur la dynamique de la cage de cryptophane complexée, au moyen d'expériences de type ROESY hors-résonance proton-proton, dont le principe est expliqué page 33. Pour mieux appréhender l'influence du camphanate, l'expérience a été menée non seulement sur **(+)** mais aussi sur l'autre diastéréomère **(-)**. En effet, le cryptophane **A** existe sous deux énantiomères selon le sens des liaisons des ethylenedioxy, indistinguables en milieu isotrope. Une fois substitués par un groupement chiral comme le camphanate, les deux molécules obtenues **(+)** et **(-)** sont diastéréomères. Par conséquent leurs propriétés physico-chimiques diffèrent, et notamment leur propriétés de complexation du xénon.

De la variation des deux degrés de liberté de la séquence ROESY hors-résonance, l'angle θ et la durée de l'application du champ B_1 (figure 17), les temps de corrélation τ_c entre paires de proton ont été extraits [**77**]. Les τ_c rendent compte, outre de la rotation globale de la molécule dans le champ magnétique extérieur, de degrés de mobilité interne. S'il est difficile d'interpréter leur valeur du fait des imprécisions de mesure, on peut en revanche regrouper les protons selon la région de la molécule dont ils proviennent. Ont ainsi été définies 6 classes présentant une mobilité interne très limitée, correspondant au CTV supérieur (T) du cryptophane dans l'orientation de la figure 24, hormis les méthoxy présentant une mobilité interne, au CTV inférieur (B), au camphanate (C) et à chacun des brins éthylenedioxy liant les cycles aromatiques de chaque CTV (M_{AD}, M_{BE}, M_{CF}). On observe (tableau 2) des τ_c significativement plus longs pour les classes T et B que pour les autres. Ceci s'explique par une mobilité interne très limitée de ces éléments rigides au sein de la molécule, du fait des trois liaisons aux brins ethylenedioxy. Le camphanate apparaît aussi plus mobile que les CTV, de par les deux liaisons mobiles reliant le substituant au reste de la molécule. Le camphanate est en effet de masse moléculaire très inférieure au cryptophane, expliquant sa plus grande mobilité dans le solvant. Enfin, malgré la présence de xénon, les brins ethylenedioxy conservent une dynamique interne non négligeable. Si aucune différence de mobilité pour une classe donnée dans **(+)** et **(-)** n'est notée, le lien M_{AD} semble beaucoup plus rigide dans **(+)** que que pour M_{BE} et M_{CF}. Une telle différence n'a pas été observée dans **(-)**. Il semble donc que dans **(+)**, le camphanate interagit plus fréquemment avec le brin le plus proche, M_{AD}, contrairement à **(-)**. Dans ces deux diastéréomères, les interactions du camphanate avec la partie cage ne sont pas de mêmes énergies. Elles semblent énergétiquement plus favorables pour **(+)** que pour **(-)**. Comme attendu, les τ_c entre protons de classes différentes sont généralement inférieurs au τ_c de chacune des classes.

classe	(+)	(-)
T	0.64 ± 0.02 (18)	0.66 ± 0.07 (10)
B	0.69 ± 0.04 (9)	0.71 ± 0.11 (6)
C	0.54 ± 0.06 (20)	0.60 ± 0.04 (10)
M_{AD}	0.61 ± 0.03 (4)	0.59 ± 0.01 (2)
M_{BE}	0.45 ± 0.07 (3)	0.57 ± 0.01 (2)
M_{CF}	0.49 ± 0.02 (3)	-

Tableau 2 : Temps de corrélation (moyenne et écart-type) observé entre paires de protons appartenant à la même classe, en picosecondes, à 8°C, dans le 1,1,2,2-tétrachloroéthane. Entre parenthèses : nombre de valeurs expérimentales. Du fait de recouvrement de signaux, aucune donnée n'est connue pour M_{CF} pour le cryptophane **(-)** [**77**].

Les différences dynamiques entre les deux diastéréomères s'accompagnent nécessairement de différences structurales. Les structures tridimensionnelles de **(+)** et **(-)** ont été obtenues par modélisation moléculaire, à partir de contraintes de distance déduites des expériences ROESY hors-résonance. La majorité des structures ne présente aucune violation de ces contraintes. Les différences

moyennes entre paires de structure, mesurées au niveau des atomes de carbone, sont très similaires pour les deux molécules. La cavité de (+) apparaît de forme beaucoup plus allongée que celle de (-), quasi-sphérique (figure 26).

La confiance accordée à ces structures a été renforcée en estimant l'effet des cycles aromatiques de la partie cryptophane, sur le déplacement chimique de tous les protons du camphanate. La différence d'effet sur **(+)** et **(-)** est bien corrélée (r=0,82) à la variation expérimentale des déplacements chimiques [**77**].

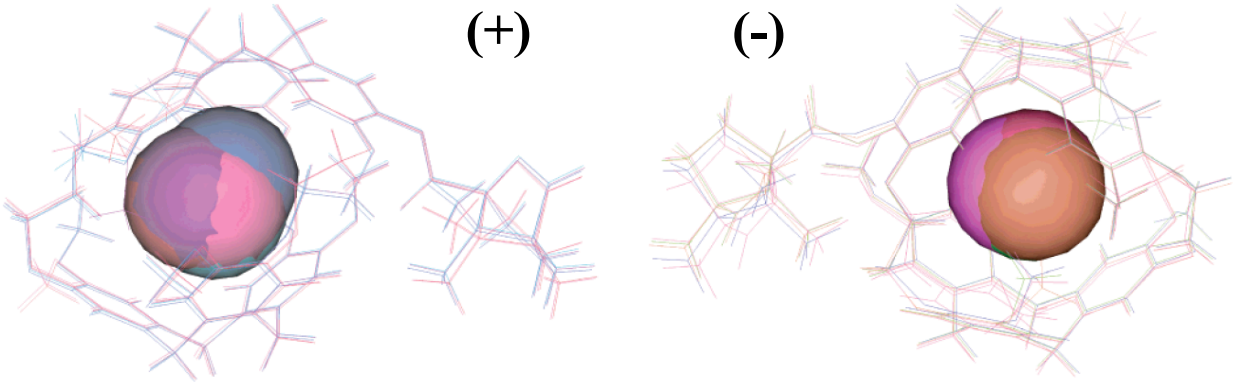


Figure 26: Superposition de 5 structures tridimensionnelles de **(+)** et **(-)**. Les hydrogènes ne sont pas représentés. Le xénon est représenté par sa sphère de van der Waals [**77**].

La déviation standard du xénon par rapport à sa position moyenne, est beaucoup plus faible pour **(-)** que pour **(+)**. Le xénon, au sein de **(+)**, semble donc pouvoir explorer un plus grand espace à une énergie comparable, ce qui stabilise sa complexation par un terme entropique plus favorable. Enfin, les brins ethylenedioxy semblent également plus mobiles dans **(+)** que dans **(-)**, au vu de la déviation standard de ces atomes de carbone, presque 2 fois plus grande que dans **(-)**. Ceci est confirmé par un plus faible temps de corrélation proton-proton au sein des brins éloignés du camphanate, M_{BE} et M_{CF}, dans **(+)** que dans **(-)**. Ces différences proviennent du positionnement moyen et dynamique différent du camphanate par rapport au cryptophane. Pour les deux molécules, un même méthyle du camphanate est très proche de deux protons différents d'un même brin ethylenedioxy de la partie cryptophane. Cependant, la corrélation entre positionnement du camphanate et dynamique du cryptophane n'est pas encore totalement comprise.

Cryptophanes hydrosolubles

Les cryptophanes hydrosolubles (**Ah**, **2h**, **3h**, **Eh**) diffèrent de leurs homologues solubles en milieu organique (**A**, **2**, **3**, **E**) par le remplacement des groupements méthoxy par des fonctions acide OCH_2COOH. Le spectre RMN du proton de ces composés a révélé l'existence d'une autre conformation des molécules, très stable à température ambiante et s'échangeant très lentement, sur des échelles de temps de jours ou plus, avec la conformation classique des cryptophanes, elle seule capable de complexer le xénon [**72**]. En effet, en plus des habituels signaux caractéristiques de molécules de haute symétrie, particulièrement distinguables dans la région des aromatiques, d'autres signaux apparaissent. Ainsi, 12 signaux de protons aromatiques ont été détectés sur le spectre de **Ah**, à coté des 2 signaux caractéristiques de la forme symétrique de la molécule. Il apparaît donc que dans cette conformation, **Ah** ait perdu tout élément de symétrie. De plus, un spectre EXSY (figure 27) a révélé que ces signaux correspondaient à des protons qui échangeaient leur environnement à l'échelle de la seconde.

Ces signaux sont en réalité caractéristiques de trois conformères équivalents, en échange lent à l'échelle de la différence de déplacement chimique d'un même proton dans ces trois environnements, dans lesquels un méthylène pontant deux aromatiques d'un seul CTV pointe vers l'intérieur de la cavité, et non vers l'extérieur (figure 28). Le CTV correspondant adopte ici une forme "selle de cheval" (S), tandis que l'autre CTV conserve la forme "couronne" (C) classique. Le cryptophane est dit alors dans la conformation CS, par opposition à la conformation CC classique, observée notamment

très majoritairement dans les cryptophanes organiques. La forme S avait déjà été observée pour des CTV moins contraints dynamiquement que les cryptophanes [**87**]. Un cryptophane, dont les ponts alkylènedioxy ont été remplacés par des ponts de plus grande taille a récemment été caractérisé comme existant sous la forme CS [**88**].

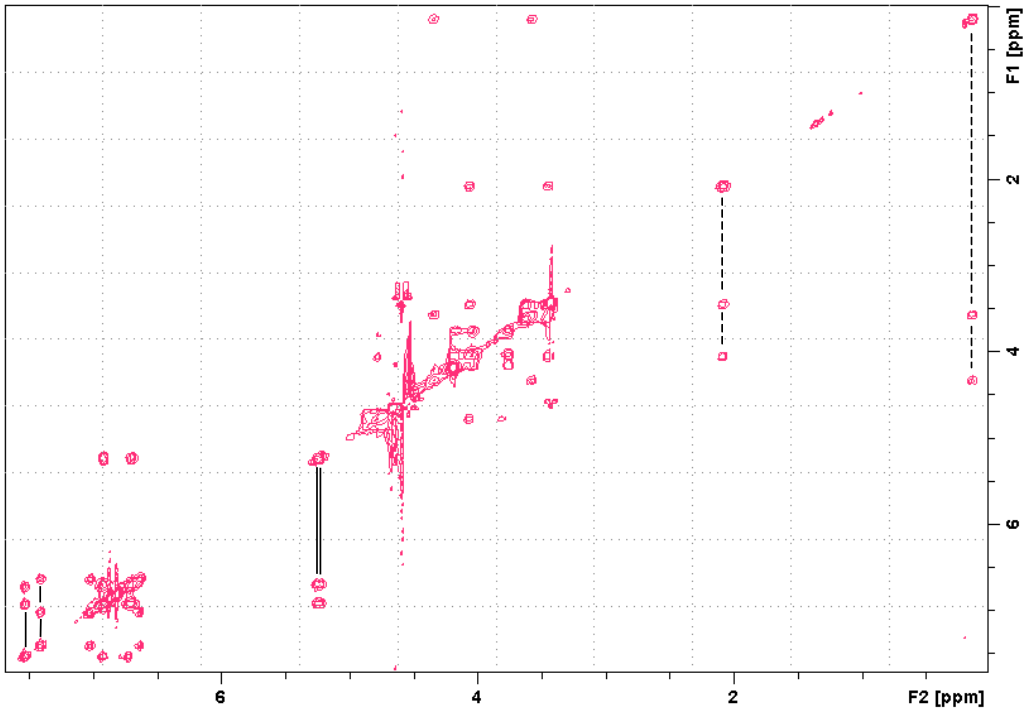


Figure 27: Spectre EXSY ^{1}H de **Ah** sous air à 50°C, 11,7T. Temps de mélange 20 ms. Les déplacements chimiques d'aromatiques en échange sont indiqués en trait plein. Les corrélations entre protons méthyléniques du CTV en forme S en échange sont indiqués en trait pointillé.

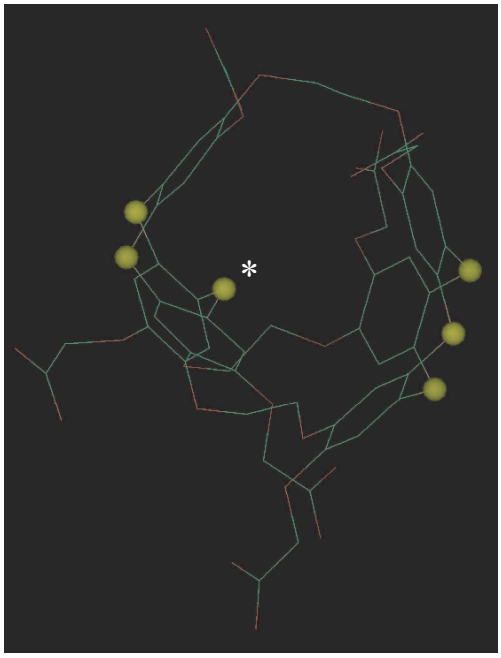


Figure 28: Structure moyenne de **Ah** sous forme CS, obtenue par modélisation moléculaire sans contraintes RMN. Les protons ne sont pas indiqués pour plus de clarté. Le CTV sous forme selle de cheval (S) est à gauche, et le carbone méthylénique pointant vers l'intérieur de la cavité est indiqué par un astérisque. Le CTV sous forme couronne (C) est à droite de la figure.

L'existence d'une conformation CS de **Ah** a été confirmée en estimant l'influence théorique des cycles aromatiques sur le déplacement chimique de chaque proton de la molécule, par comparaison aux déplacements chimiques dans la forme CC, à partir de la structure moyenne de la molécule calculée par dynamique moléculaire. Ces valeurs sont en effet très bien corrélées aux valeurs expérimentales (r=0.94). A 298K, la vitesse d'échange entre les 3 formes CS équivalentes extraite de spectres EXSY est de 2.3 s^{-1}, soit une énergie d'activation de 79 $kJ.mol^{-1}$. Comparativement à la vitesse d'échange entre les formes CC et CS, de l'ordre du jour voire plus, l'échange CS-CS admet nécessairement un autre état de transition que la forme CC. L'état le plus probable, même si aucune preuve expérimentale n'a encore été apportée, consiste en le retournement simultané de deux méthylènes d'un même CTV. D'ailleurs, un modèle moléculaire à l'aide de tiges métalliques figurant les liaisons chimiques indique que cet état de transition est possible, et permet le passage entre deux formes CS beaucoup plus facilement qu'en ayant recours à la forme CC.

La cinétique et la thermodynamique du passage entre les formes CC et CS, accessibles expérimentalement, sont extrêmement difficiles à relier à des mécanismes moléculaires, puisque des phénomènes très rares aux énergies d'activation très élevées sont impliqués. On peut donc imaginer que la présence d'impuretés, de gaz dissous, d'interactions avec la surface du tube RMN, etc… même en très faible quantité modifient suffisamment l'énergie d'activation pour bouleverser les valeurs expérimentales de l'équilibre. Sans quantifier ni expliquer le phénomène, nous avons observé que le bullage à l'hélium durant plusieurs heures modifie l'équilibre en faveur de la forme CC, tout comme une forte pression de xénon, mais au contraire un échantillon laissé sous une atmosphère d'air tend vers un accroissement de la forme CS. Des procédés simples permettent donc de s'affranchir facilement et durant des périodes de temps très longues de la présence de formes CS, ce qui est important pour complexer efficacement une grande quantité de xénon par des cryptophanes dans l'optique de la réalisation d'une biosonde.

Les spectres proton des cryptophanes **2h**, **3h** et **Eh** présentent eux aussi des signaux qui ne correspondent pas à la forme CC et pourraient donc être attribués à des formes CS. Cependant, pour les cryptophanes asymétriques **2h** et **3h**, les trois conformations CS ne sont plus équivalentes et l'on s'attend donc à observer trois fois plus de signaux, pour atteindre par exemple 36 signaux de protons aromatiques. Il faut aussi noter que le cryptophane **E** existe sous une conformation encore différente, dans laquelle un des CTV est entièrement retourné [**89**]. Son homologue hydrosoluble **Eh** pourrait aussi coexister dans cette conformation.

II-E-2. Cinétique de la complexation du xénon

Nous avons présenté au chapitre précédent la caractérisation structurale et dynamique de cryptophanes complexé par un atome de xénon. Nous allons maintenant aborder la cinétique d'entrée-sortie du xénon dans les cavités de cryptophanes.

Cryptophanes organiques

La vitesse d'échange dépend de la concentration de xénon, indiquant que le mécanisme d'échange consiste non seulement en son départ spontané de la cage (cinétique d'ordre 1), mais peut aussi résulter de son expulsion consécutive à l'insertion d'un autre atome de xénon (cinétique d'ordre 2). Ceci est clairement visible sur les spectres d'un mélange de cryptophanes **A**, **(+)** et **(-)** obtenu à des pressions de xénon très différentes (figure 29). Le signal du xénon dans les cages est plus large à haute pression du fait du plus grand nombre de xénons libres en solution susceptible d'exclure un atome de xénon des cages, par un mécanisme du 2^{nd} ordre. Cependant, une plus grande proportion de cages étant vides à basse pression, on remarque que chaque xénon libre est plus rapidement susceptible d'être complexé par une cage vide que par une cage pleine. Le xénon est donc susceptible de quitter spontanément la cage selon le processus de 1^{er} ordre. Le mécanisme d'échange le plus efficace dépend donc de la pression.

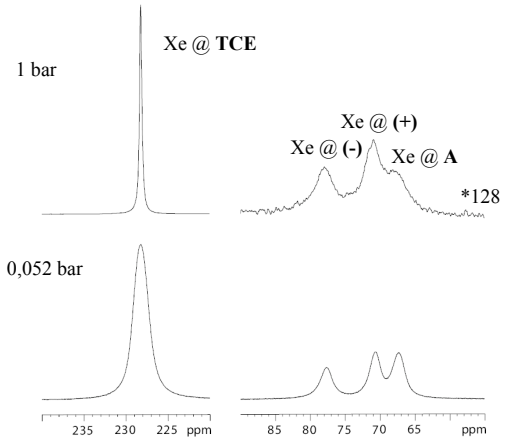


Figure 29: spectres d'un mélange de **A**, **(+)** et **(-)** aux concentrations de 2,80, 1,34 et 1,46 mM respectivement, dans le 1,1,2,2 tétrachloroéthane, à 283K, 11,7T sous 1 et 0,052 bar de xénon. Pour le spectre sous 1 bar, la partie droite du spectre a été augmentée d'un facteur 128 par rapport à la partie gauche.

Cryptophanes hydrosolubles

L'échange assez lent observé dans l'étude des cryptophanes permet d'estimer facilement les vitesses d'échange k du xénon dans chaque environnement, à partir des largeurs à mi-hauteur $\Delta\nu_{1/2}$ des signaux ^{129}Xe correspondants ($k=\pi\,\Delta\nu_{1/2}$). Une composante de ces largeurs provient de l'inhomogénéité du champ magnétique au niveau de la bobine de réception du signal xénon, mais en comparant un grand nombre de spectres d'un mélange des quatre cryptophanes hydrosolubles **Ah**, **2h**, **3h**, **Eh**, la vitesse d'échange du xénon des cavités de a été estimée à 3,2, 11, 37 et 90 s^{-1} à 16 °C sous 1 bar, soit une concentration de xénon en solution de 4,5mM [**72**].

II-E-3. Thermodynamique de la complexation xénon-cryptophanes

Outre la cinétique d'échange, la connaissance des constantes de complexation K est importante car elle permet de comparer les cages quant à leur capacité à complexer et transporter le xénon. Comme nous le verrons, ces constantes sont très élevées (jusqu'à 7000 M^{-1}) et leur détermination nécessite de prendre quelques précautions.

Détermination de constantes de complexation

Deux méthodes ont été développées, l'une à partir de spectres de xénon polarisé, l'autre à partir de l'évolution de spectres proton en fonction de la pression de gaz rare au-dessus de l'échantillon. K se calcule selon l'expression bien connue :

$$K = [\text{xénon-cryptophane}] / [\text{xénon}][\text{cryptophane}]$$

La première méthode consiste à enregistrer le spectre de xénon polarisé peu de temps après son transfert dans un tube RMN contenant le cryptophane en solution. La pression de gaz au-dessus de la solution étant estimée, soit à partir de la connaissance du nombre de moles de gaz dans la cellule de pompage avant transfert vers le tube RMN, soit par mesure après l'expérience, et la solubilité du gaz en solution étant elle aussi connue, la concentration de xénon libre en solution peut être évaluée. Le rapport de l'aire des deux signaux ^{129}Xe procure alors la concentration en cage complexée. Enfin, connaissant la concentration totale de cryptophane, connue par la pesée aussi précise que possible de la poudre de cryptophane avant sa dissolution, la concentration de cage libre est calculée, et l'on obtient la constante de complexation K.

Cependant, un grand nombre de paramètres entrave la détermination précise de K. Il est nécessaire de travailler à basse pression de xénon pour éviter d'entièrement saturer les cages, mais en détectant pour autant le signal de xénon libre en solution avec une sensibilité correcte. Ceci implique l'utilisation de xénon polarisé et donc l'acquisition rapide des spectres après transfert du xénon vers le tube RMN.

Il est alors nécessaire de s'assurer que l'équilibre du gaz rare entre les phases gazeuse et liquide est atteint au moment de l'enregistrement du spectre. L'acquisition de spectres successifs, nécessairement de sensibilité décroissante de par le caractère transitoire de l'aimantation du xénon, entrecoupés de l'agitation manuelle du tube pour que l'équilibre ait lieu, permet de s'assurer de cet équilibre. La cinétique d'entrée-sortie du xénon dans les cryptophanes est par contre très rapide devant les autres délais de l'expérience. La pression doit elle aussi être précisément connue. Or la valeur de la pression de gaz rare initialement introduite dans la cellule de pompage n'est pas une donnée assez précise car les pertes de xénon lors du transfert jusqu'au tube RMN ne sont pas totalement reproductibles. La mesure de la pression de xénon après l'expérience dans un volume équipé d'une jauge de pression réclame également quelques précautions. De plus, si le volume du tube est assez bien déterminé, celui du solvant est susceptible de diminuer d'une expérience à l'autre par évaporation lors des différentes manipulations de détentes gazeuses et de dégazages. La masse de produit solide pesée est elle aussi difficilement précise à mieux que 0,1 mg. Enfin, il peut être nécessaire de calculer au moyen d'un spectre proton le taux de molécules en forme CC, seules susceptibles de complexer le xénon (Cf. paragraphe II-E-1). Un calcul de Monte-Carlo, à partir des erreurs estimées des différents paramètres expérimentaux, a abouti aux estimations des constantes de complexation dans les cryptophanes hydrosolubles (tableau 3).

Une autre méthode pour déterminer les constantes de complexation consiste en le suivi de l'évolution des signaux proton en fonction de la pression croissante de xénon. En effet, certains d'entre eux, et notamment parmi les protons aromatiques, diffèrent en déplacement chimique selon que la cage est vide ou pleine. Le déplacement chimique observé permet de mesurer l'intégrale des signaux et ainsi de connaître le taux de cages complexées. Pour améliorer la précision, l'opération est répétée sur la plus large gamme de pression possible, entre 2 torr et 6 bar environ. La méthode présente l'avantage de pouvoir attendre le temps nécessaire à l'équilibre entre les phases gazeuse et liquide. Cependant, la résolution imparfaite des signaux protons limite la précision de la mesure de leur aire. L'accumulation des erreurs lors d'ajouts successifs de xénon est partiellement compensée en enregistrant quelques spectres après détente partielle du xénon et donc mesure plus précise de la pression.

Une troisième méthode consiste à observer une compétition de complexation par des spectres RMN proton ou xénon de deux molécules, dont le xénon, avec un même cryptophane, ou bien la compétition de plusieurs cryptophanes pour un même complexant, en l'occurrence le xénon. A partir de la connaissance d'une constante de complexation, on peut en déduire l'autre.

Cryptophanes organiques

Cette dernière méthode a été employée au laboratoire pour estimer la constante de complexation du xénon avec **(+)** et **(-)**, par comparaison avec la valeur connue de la constante de complexation de **A,** qui est de 3900 M^{-1} à 5°C [**69**]. Les valeurs obtenues sont supérieures à 3200 et 2000 M^{-1} respectivement pour **(+)** et **(-)** à 283K [**77**]. Elle est en tout état de cause plus grande pour **(+)** que pour **(-)**. Ce résultat est en parfait accord avec la dynamique plus favorable du xénon dans (+), comme observé par modélisation (figure 26) et par ROESY hors-résonance (tableau 2).

Cryptophanes hydrosolubles

Les constantes de complexation ont été mesurées pour les cryptophanes **Ah**, **2h**, **3h** et **Eh** par la première méthode exposée, et sont confirmées par les valeurs obtenues pour **3h** et **Eh** par la deuxième méthode (tableau 3).

	Spectre ^{129}Xe		Spectres ^{1}H	
Cryptophane	Average	Intervalle de confiance de 90%	Moyenne	Intervalle de confiance de 90%
Ah	6800	5600 – 9100	Non mesuré	Non mesuré
2h	2200	1800 – 2600	Non mesuré	Non mesuré
3h	2200	1200 – 50000	1600	700-3500
Eh	1000	600 – 4100	900	300 – 2100

Tableau 3: valeurs et intervalles de confiance des constantes de complexation cryptophanes hydrosolubles – xénon à 293K dans D_2O, estimées selon deux méthodes fondées sur la mesure d'intégration de signaux dans des spectres ^{129}Xe et ^{1}H, comme précisé dans le texte [**72**].

Ces constantes de complexation sont supérieures à celles mesurées pour la série homologue des cryptophanes organiques **A**, **2**, **3** et **E**, pour lesquelles K vaut respectivement 3900, 2810, 810 et moins de 10 M^{-1} respectivement, à température légèrement inférieure [70, 69]. L'influence du pH sur K dans la gamme 5-12 semble négligeable. On peut donc faire l'hypothèse que d'une manière générale, des groupements de faible encombrement, comme les groupement méthoxy et acétate influencent peu cette valeur. La différence principale résulte plutôt de la solvatation du xénon.

Deux paramètres sont à prendre en compte. Le 1,1,2,2-tétrachloroéthane étant un solvant beaucoup moins polaire que l'eau, la dissolution d'un atome de xénon y est donc moins coûteuse en énergie, comme l'attestent les solubilités relatives, respectivement 103 et 4.3 mM/bar à température ambiante. Si l'énergie de la cage complexée par un xénon est indépendante du solvant dans lequel baigne la cage, le gain énergétique lié à la complexation est donc plus favorable en milieu aqueux, en accord avec le rapport des constantes de complexation expérimentales. Le second paramètre est la taille du solvant. Le volume d'une molécule de tétrachloroéthane (105 $Å^3$) ne lui permet pas d'entrer dans les cages, sauf peut-être dans **E**. Pour ce cryptophane, la très faible complexation du xénon pour ce cryptophane pourrait résulter d'une compétition avec le solvant. Malgré la petite taille des molécules d'eau, qui peuvent donc entrer dans les cages de tous les cryptophanes hydrosolubles et donc concurrencer le xénon, les fortes constantes de complexation tendent à montrer que l'eau n'est pas énergétiquement stabilisée dans la cage. Il peut s'agir d'un terme enthalpique, comme par exemple l'absence de certaines liaisons hydrogène stabilisatrices entre molécules d'eau. Il peut aussi résulter d'un terme entropique, rendant compte de molécules d'eau très structurées dans la cavité, et offrant donc peu de degrés de liberté. Dans tous les cas, l'eau s'avère un solvant peu concurrentiel pour le xénon dans le cadre de la complexation des cryptophanes.

III. Conclusion-Perspectives

Au cours de ces 13 dernières années, je me suis employé à caractériser par RMN des systèmes empruntés à la chimie, la biochimie ou la biologie cellulaire, en phase liquide. Ceci m'amène à faire le bilan suivant.

On peut aborder une problématique par RMN, associée ou non à d'autres techniques, de manière analytique. Elle consiste à extraire d'un système trop complexe, comme une cellule entière, un sous-ensemble que l'on pourra mieux décrire. Pour cela, la RMN offre un large éventail d'approches pour obtenir des informations sur la dynamique, la structure de chaque molécule prise isolément, ou sur l'ensemble des composés présents. Encore faut-il prendre des précautions quant aux données obtenues par RMN. Ainsi, parler de la "structure" d'une molécule en solution recèle deux simplifications excessives.

D'une part, la structure moyenne de molécules ou de complexes moléculaires en solution peut être biaisée par les paramètres expérimentaux choisis pour y aboutir. Par exemple, un changement de distance lent devant les fréquences de résonance entre deux noyaux, aboutit à un Effet Overhauser Nucléaire (NOE) correspondant à une distance plus courte que la distance moyenne au cours du temps entre ces noyaux. Un très grand nombre de valeurs expérimentales d'effets NOEs permet, dans le cas de protéines par exemple, de fournir une structure acceptable de la molécule. Le fait qu'elle soit très souvent en accord avec la technique fondée sur des principes complètement différents de ceux de la cristallographie aux rayons X, qui biaise également la réalité par le simple fait de cristalliser la molécule ou complexe, permet de se faire une idée du degré d'acceptabilité de la structure.

D'autre part, la structure moyenne ne rend pas compte de la dynamique interne. Or les molécules en solution sont sujets à des mouvements à des échelles de temps et des amplitudes spatiales très variées. La dynamique du solvant a aussi une importance fondamentale. Dans la réalité du monde cellulaire, deux molécules n'interagissent donc pas seulement, et pas nécessairement, à partir de leur conformation moyenne, mais explorent un espace conformationnel. Elles n'interagiront que si leurs conformations et orientations relatives sont favorables. Il serait donc très intéressant de caractériser au mieux ces dynamiques moléculaires non seulement fréquentiellement, mais aussi spatialement. Mais même la méthode de description de ces dynamiques est complexe. Une caractérisation totale est hors de portée, et quand bien même on y parvenait, la quantité d'information nécessaire à sa description serait trop volumineuse pour être utilisable. On peut ainsi faire le parallèle avec la caractérisation totale d'un gaz à faible pression, elle-aussi impossible, mais bien décrite par la théorie des gaz parfaits. A partir de quelques paramètres macroscopiques (pression, température), la distribution statistique des propriétés de molécules, par exemple leur vitesse, peut être prédite. Il n'en est pour l'instant pas de même pour des systèmes complexes en phase liquide. Dans le cas de milieux cellulaires, les notions même de constantes de complexation, de cinétique chimique, de libre parcours moyen moléculaire, établies en milieu dilué et dans un grand volume, sont discutables dans un milieu aussi dense et de petite dimension que l'intérieur d'une cellule. Celle-ci, dont le volume se compte en femtolitres, contient en effet environ 70% en masse d'eau seulement. Les autres composés, macromolécules, métabolites, ions, sont de l'ordre de quelques centaines de milliards. Les plus rares d'entre eux existent probablement à quelques exemplaires ou n'apparaissent même que dans des conditions de vie particulières.

L'approche synthétique consiste au contraire à observer l'ensemble du système, et, toujours dans le cas du fonctionnement cellulaire, à extraire des informations concernant l'état général de la cellule ou un mécanisme particulier. Pour cela, on utilise des sondes intrinsèques, comme le déplacement chimique ^{31}P du phosphate qui rend compte du pH environnant, ou des sondes extrinsèques, à base par exemple de carbone 13 ou de fluor 19. Cette approche ne propose que rarement la description de mécanismes biologiques à l'échelle moléculaire. Elle présente par contre l'avantage d'aborder le sujet d'étude dans des conditions physiologiques contrôlées.

Dans ce contexte se pose la question de ce que je pourrais apporter à cet effort général de recherche [**90**]. En collaboration avec des biologistes, des bioinformaticiens et des spécialistes d'autres techniques analytiques, j'envisage différentes approches.

Pour remédier à la faible sensibilité de la RMN, le nouveau concept de polarisation par champ dipolaire [**55**] pourrait permettre d'observer tout type de noyau avec une sensibilité augmentée de plusieurs ordres de grandeur.

Une approche complémentaire consiste à proposer de nouvelles sondes moléculaires exogènes. L'idée de biosondes moléculaires [**79**] composées d'un atome de xénon hyperpolarisé, complexé par une molécule-cage munie d'un substituant capable de complexer spécifiquement une cible donnée dans la cellule, mérite d'être développée. Le signal observé proviendrait alors uniquement de la molécule-cible, et profiterait de la forte sensibilité du xénon polarisé au regard d'autres sondes utilisant des noyaux différents.

On peut aussi imaginer encapsuler dans les cryptophanes des molécules hydrophobes protonées de petite taille, souvent à l'état gazeux dans les conditions normales de pression et de température. Le caractère aromatique de la cage induit des déplacements chimiques des gaz encapsulés différents de la gamme classique rencontrée dans les systèmes vivants, et une imagerie de déplacement chimique spécifique pourrait être envisagée.

Une méthode radicalement différente consiste à greffer un substituant paramagnétique à la molécule-cage de manière à accélérer la relaxation nucléaire du xénon, jusqu'à atteindre des valeurs de l'ordre de la seconde, valeurs permettant une répétition rapide des acquisitions sans élargir démesurément les signaux. Le xénon ne pourrait plus être maintenu à l'état hyperpolarisé. Le taux de répétition de l'expérience serait par contre beaucoup plus favorable et permettrait d'appliquer des séquences RMN multidimensionnelles avec une meilleure stabilité. Cette information viendrait compléter les données provenant de l'effet direct éventuel du paramagnétique sur la cible. Ce principe pourrait alors être étendu à d'autres noyaux encore plus sensibles en déplacement chimique que le xénon, comme l'yttrium.

Beyond the study of homogeneous systems, heterogeneous ones, as cells,

Outre l'étude de systèmes homogènes, on peut envisager celle de milieux cellulaires hétérogènes, pour lesquelles un stress quelconque (température, polluant, …) est appliqué sur la partie supérieure de l'échantillon. A l'aide de méthodes précédemment exposées permettant d'améliorer la sensibilité, de techniques d'imagerie spectroscopique, et d'une résolue temporelle créée par la répétition de l'enregistrement des mêmes images, la notion de diffusion d'un stress dans un milieu cellulaire serait abordée. De plus, la caractérisation de l'évolution du milieu cellulaire, et par conséquent la mise en évidence des mécanismes inhérents, seraient facilitées par la comparaison directe de spectres résolus en déplacement chimique, mono ou multidimensionnels, obtenus en différentes positions de l'échantillon et à différents instants.

Références

1 Gonzalez B, Huber JG, Piotto M et Renaud M, 2000. Brevets n°FR2815357, EP1410055, US20030199751, WO0231523.
2 Keun, HC, Pharmacology & Therapeutics 2006, **109**, 92 – 106.
3 Gonzalez B, Huber JG et d'Auriol L, 2000. Brevets n° FR2816713, EP 1342097, WO0241021.
4 Frydman L, Scherf T et Lupulescu, A, PNAS 2002, **99**, 15858-15862.
5 Luo X, Chen Y, Huber JG, Zhang Y et Sinaÿ P, Comptes Rendus Chimie, 2004, **7**, 25-28.
6 Chen Y, Huber JG, Zhang Y et Sinaÿ P, Comptes Rendus Chimie, 2005, 8, 27-30.
7 Solomon I, Phys. Rev., 1955, **99**, 559-565.
8 Bertini I et Luchinat C, Coord. Chem. Rev., 1996, **150**, 77-110.
9 Bertini I, Ciurli S et Luchinat C, Struct. Bonding, 1995, **83**, 1-54.
10 Wüthrich, K, 1986, "NMR of proteins and nucleic acids", Wiley Interscience Publish.
11 Banci L, Bertini I, Huber JG, Spyroulias GA, et Turano P, J. Biol. Inorg. Chem., 1999, **4**, 21-31.
12 Wishart DS, Sykes BD et Richards FM, J. Mol. Biol., 1991, **222**, 311-333.
13 Huber JG, Gaillard J et Moulis J-M, Biochemistry, 1995, **34**, 194-205.
14 Carter CWJr, Kraut J, Freer ST, Xuong NH, Alden RA et Bartsch RG, J. Biol. Chem. 1974, **249**, 4212-4225.
15 Huber JG, Moulis J-M et Gaillard J, Biochemistry, 1996, **35**, 12705-12711.
16 Mouesca J-M, Noodleman L, Case DA et Lamotte B, Inorg. Chem. 1995, **34**, 4347-4359.
17 Bertini I, Capozzi F, Eltis LD, Felli IC, Luchinat C et Piccioli M, Inorg. Chem. 1995, **34**, 2516-2523.
18 Banci L, Bertini I, Huber JG, Luchinat C et Rosato A, J. Am. Chem. Soc., 1998, **120**, 12903-12909.
19 Banci L, Bertini I, Ferroni, F et Rosato, A, Eur. J. Biochem., 1997, **249**, 270-279.
20 Arnesano F, Banci L, Bertini I et Felli, IC, Biochemistry, 1998, **37**, 173-184.
21 Bushnell GW, Louie GV et Brayer GD, 1990, J. Mol. Biol. **214**, 585-595.
22 Banci L, Bertini I, Gray HB, Luchinat L, Reddig T, Rosato A et Turano P, 1997, Biochemistry, **36**, 9867-877.
23 Modig K, Liepinsh E, Otting G et Halle B, J. Am. Chem. Soc. 2004, **126**, 102-114.
24 Kumar Pal S, Peon J, Bagchi B et Zewail AH, J. Phys. Chem. B 2002, **106**, 12376-12395.
25 Bertini I, Dalvit C, Huber JG, Luchinat C et Piccioli M, FEBS letters, 1997, **415**, 45-48.
26 Bertini I, Huber JG, Luchinat C et Piccioli M, J. Magn. Reson., 2000, **147**, 1-8.
27 Dalvit, J. Magn. Reson., 1996, **B 112**, 282–288.
28 Fetrow, JS‡et Baxter, SM, Biochemistry 1999, **38**, 4480-4492.
29 Gottlieb HE, Kotlyar V et Nudelman A, J. Org. Chem., 1997, **62**, 7512-7515.
30 Bushnell GW, Louie GV et Brayer GD, J. Mol. Biol., 1990, **214**, 585-595.
31 Qi PX, Urbauer JL, Fuentes EJ, Leopold MF et Wand AJ, Nat. Struct. Biol., 1994, **6**, 378-382.
32 Qi PX, Beckman RA et Wand AJ, Biochemistry, 1996, **35**, 12275-12286.
33 Qi PX, Di Stefano LD et Wand AJ, Biochemistry, 1994, **33**, 6408-6417.
34 Kyritsis P, Huber JG, Quinkal I, Gaillard J et Moulis J-M, Biochemistry, 1997, **36**, 7839-7846.
35 Moser CC, Keske JM, Warncke K, Farid RS et Dutton PL, Nature, 1992, **355**, 796-802.
36 Winkler JR et Gray HB, Chem. Rev., 1992, **92**, 369-379.
37 Duée ED, Fanchon E, Vicat J, Sieker L, Meyer J et Moulis J-M, J. Mol. Biol., 1994, **243**, 683-695.
38 Kyritsis P, Kümmerle R, Huber JG, Gaillard J, Guigliarelli B, Popescu C, Münck E et Moulis J-M, Biochemistry, 1999, **39**, 6335-6345.
39 Stombaugh NA, Sundquist JE, Burris SH et Orme-Johnson WH, Biochemistry, 1976, **15**, 2633-2641.
40 Smith ET et Feinberg BA, J. Biol. Chem., 1990, **265**, 5125-5128.
41 Kummerle R, Kyritsis P, Gaillard J et Moulis J-M, J. Inorg. Biochem., 2000, **79**, 83-91.
42 Kummerle R, Gaillard J, Kyritsis P, et Moulis J-M, JBIC, 2001, **6**, 446-451.
43 N. Bartlett, Proc. Chem. Soc. (1962) 218
44 Wilhelm E, Battino R et Wilcock RJ, Chem. Rev., 1977, **77**, 219-262.
45 Desvaux H, Gautier T, Le Goff G, Pétro M, Berthault P, Eur. Phys. J. D, 2000, **12**, 289-296.
46 Cates GD, Benton DR, Gatzke M, Happer W, Hasson KC et Newbury NR, Phys. Rev. Lett. 1990, **66**, 2591-2594.
47 Albert MS, Balamore D, Kacher DF, Venkatesh AK, et Jolesz FA, NMR Biomed. 2000, **13**, 404-414.
48 Goodson BM, J. Magn. Reson., 2002, **155**, 157-216.
49 Berthault P et Desvaux H, Eur. Phys. J. D, 2003, **22**, 65-73
50 Navon G, Song, Y-Q, Rõõm T, Appelt S, Taylor RE et Pines A, Science, 1996, **271**, 1848-1851.
51 Berthault P, Desvaux H, Le Goff G et Pétro M, Chem. Phys. Lett., 1999, **314**, 52-56.
52 Berthault P, Huber G, Ha PH, Dubois L, Desvaux H et Guittet E, ChemBioChem, 2006, **7**, 59-64.

53 Bohlen J-M, Martial Rey M et Bodenhausen G, J. Magn. Reson., 1989, **84**, 191-197.
54 Dubois L, Da Silva P, Landon C, Huber JG, Ponchet M, Vovelle F, Berthault P et Desvaux H, J. Am. Chem. Soc., 2004, **126**, 15738-15746.
55 Desvaux H, Huber G, Ha PT, Dubois L, Marion D et Berthault P, soumis.
56 Landon C, Berthault P, Vovelle F et Desvaux H, Prot. Sci., 2001, **10**, 762-770.
57 Dubois L, Parrès S, Huber JG, Berthault P et Desvaux H, J. Phys. Chem. B, 2004, **108**, 767-773.
58 Desvaux H, Dubois L, Huber G, Quillin ML, Berthault P, Matthews BW, J. Am. Chem. Soc., 2005, **127**, 11676-11683.
59 Rubin SM, Spence MM, Goodson BM, Wemmer DE et Pines A, Proc. Nat. Acad. Sci., 1997, **97**, 9472-9475.
60 Quillin ML, Breyer WA, Grisworld IJ et Matthews BW, J. Mol. Biol., 2000, **302**, 955-977.
61 Da Silva P, Landon C, Industri B, Marais A, Ponchet M et Vovelle F, Proteins:Struct., Funct., Bioinf. 2005, **59**, 356-67.
62 Farrow NA, Muhandiram R, Singer AU, Pascal SM, Kay CM, Gish G, Shoelson SE, Pawson T, Forman-Kay JD et Kay LE, Biochemistry, 1994, **33**, 5984-6003.
63 Desvaux H et Berthault P, Prog. NMR Spectrosc., 1999, **35**, 295-340.
64 Mulder FAA, Mittermaier A, Hon B, Dalquist FW et Kay LE, Nat. Struct. Biol., 2001, **8**, 932-935.
65 Fefeu S, Bouaziz S, Huet J-C, Pernollet J-C et Guittet E, Prot. Sci., 1997, **6**, 2279-2284.
66 Boissy G, O'Donohue M, Gaudemer O, Perez V, Pernollet J-C et Brunie S, Prot. Sci. 1999, **8**, 1191-1199.
67 Canceill J, Lacombe L et Collet A, J. Am. Chem. Soc., 1985, **107**, 6993-6996.
68 Collet A, Dutasta J-P, Lozach B et Canceill J, Top. Curr. Chem., 1993, **165**, 103-129.
69 Bartik K, Luhmer M, Dutasta J-P, Collet A et Reisse J, J. Am. Chem. Soc., 1998, **120**, 784-791.
70 Brotin T et Dutasta J-P, Eur. J. Org. Chem., 2003, 973-984.
71 Sears D N et Jameson C J, J. Chem. Phys., 2003, 119, **23**, 12234-12244
72 Huber G, Brotin T, Dubois L, Desvaux H, Dutasta JP et Berthault P, J. Am. Chem. Soc., sous presse.
73 Brotin T, Lesage A, Emsley L et Collet A, J. Am. Chem. Soc., 2000, **122**, 1171-1174.
74 Brotin T, Devic T, Lesage A, Emsley L et Collet A, Chemistry, 2001, **7**, 1561-1573.
75 Bartik K, El Haouaj M, Luhmer M, Collet A et Reisse J, ChemPhysChem, 2000, **4**, 221-224.
76 Darzac, M, Brotin T, Rousset L, Bouchu D et Dutasta J-P, New J. Chem., 2004, **28**, 502-512.
77 Huber JG, Dubois L, Desvaux H, Brotin T, Dutasta JP et Berthault P, J. Phys. Chem. A, 2004, **108**, 9608-9615.
78 Luhmer M, Goodson BM, Song Y-Q, Laws DD, Kaiser L, Cyrier MC et Pines A, J. Am. Chem. Soc., 1999, **121**, 3502-3512.
79 Spence MM, Rubin SM, Dimitrov IE, Ruiz EJ, Wemmer DE, Pines A, Qin Yao S, Tian F et Schultz PG, Proc. Nat. Acad. Sci., 2001, **98**, 10654-10657.
80 Spence MM, Ruiz EJ, Rubin SM, Lowery TJ, Wissinger N, Schultz PG, Wemmer DE et Pines A**,** 2004, **126**, 15287-15294.
81 Pons M et Millet O, Prog. Nucl. Magn. Res. Sp., 2001, **38**, 267-324.
82 Goodson BM, J. Magn. Reson., 2002, **155**, 157-216.
83 Cherubini A et Bifone A, Prog. Nucl. Magn. Res. Sp., 2003, **42**, 1-30.
84 Rudkevich DM et Leontiev AV, Aust. J. Chem., 2004, **57**, 713-722.
85 Desvaux H, Huber JG, Brotin T, Dutasta J-P et Berthault P, Chem Phys Chem, 2003, **4**, 384-387.
86 Dubois L, Berthault P, Huber JG et Desvaux H, C. R. Physique, 2004, **5**, 3, 305-313.
87 Zimmermann H, Tolstoy P, Limbach H-H, Poupko R et Luz Z, J. Phys. Chem. B, 2004, **108**, 18772-18778.
88 Mough S T, Goeltz J C et Holman K T, Angew. Chem. Int. Ed., 2004, **43**, 5631-5635.
89 Lozach B, thèse de doctorat 1991, Université Lyon I.
90 Latterich M, Prot. Sci., 2005, **3**:8.

IV. Curriculum vitæ

Gaspard HUBER

Marié. 1 enfant
Prénoms Etat civil : Jean, Gaspard, Adrien
Né le 09 mars 1969, Paris 13ème

☎ : 01 69 08 64 82
Fax : 01 69 08 98 06
e-mail : ghuber@cea.fr

ACTIVITE ACTUELLE

2002 - 2006 **Chercheur**
en RMN appliquée à la biophysique et à la physico-chimie
au Commissariat à l'Energie Atomique, Saclay,
Direction des Sciences de la Matière, Département de Recherche sur l'Etat Condensé, les Atomes et les Molécules, Service de Chimie Moléculaire
URA 331 CEA/CNRS, Laboratoire de Structure et Dynamique par Résonance Magnétique

ACTIVITES ANTERIEURES

1999 - 2001 **Chef de projet RMN**
Metabolic Explorer, société naissante de biotechnologie.
Elaborations méthodologiques de caractérisation de profils métabolomiques cellulaires.
Collaboration avec Michèle Borel et Daniel Morvan, INSERM U484, Clermont-Ferrand.

1998 - 1999 **Post-doctorat 2**
Equipe de Dr. Françoise Guerlesquin.
Laboratoire BIP, CNRS/IBSM, 31 Chemin Joseph Aiguier, 13402 Marseille Cedex 20
Thème : Surexpression, purification et étude par résonance magnétique nucléaire (RMN) de Dsvd, une protéine susceptible d'être impliquée dans la réduction du sulfate de la bactérie *Desulfovibrio*.
Bourse EMBO (6 mois).

1996 - 1998 **Post-doctorat 1**
Centre de Résonance Magnétique, Université de Florence (Italie), sous la direction du Pr. Ivano Bertini.
Thème : Etude des interactions eau-cytochrome c de cœur de cheval et de l'orientation partielle de cytochromes dans le champ magnétique par RMN homo et hétéronucléaire.
Bourse de l'union européenne.

1993 - 1996 **Thèse**
Université Joseph Fourier, Grenoble.
Laboratoire de Spectroscopie de Complexes Polymétalliques et Métalloprotéines
DRFMC, Commissariat à l'Energie Atomique (CEA), Grenoble.
Titre : RMN de protéines [4Fe-4S] :
Propriétés structurales et transfert électronique intramoléculaire.
Sous la direction du Dr. Jacques Gaillard. Laboratoire de Dr. Bernard Lamotte.
Bourse CFR.

1992-1993 **DEA d'analyses physico-chimiques et chimie analytique**
Université Lyon I.
Stage au laboratoire de Photocatalyse, Catalyse et Environnement, Ecole Centrale de Lyon, CNRS, Ecully.
Thème : Caractérisation des produits de dégradation du lindane, un pesticide chloré, par pHmétrie et chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse.
Sous la direction du Dr. Can Hoang-Van. Laboratoire de Dr. Pierre Pichat.

FORMATION INITIALE

1989-1993 **Ecole d'ingénieur chimiste ESCIL**
(Ecole Supérieure de Chimie Industrielle de Lyon, devenue CPE depuis, après fusion avec une école d'électronique)

ENSEIGNEMENT, ENCADREMENT D'ETUDIANTS

Encadrement d'étudiants en 1994, 1995, 1999, 2004, 2005, 2006

Enseignement

2004 Enseignement RMN à l'INSTN

1998 Travaux Pratiques de DEA de Biologie cellulaire, biologie structurale et microbiologie
(6 heures)
Université Aix-Marseille
Sujet : Enregistrement et attribution de spectres RMN homo et hétéronucléaires de protéines.

1996 DEUG première année MIAS et SM2A (48 heures)
Université Joseph Fourier
Sujet : Principe de la thermodynamique et application à la chimie.

1995 Enquête auprès des étudiants sur l'utilisation du logiciel Autoéval, logiciel d'autoévaluation des étudiants
Université Joseph Fourier

LANGUES

- Anglais : courant
- Italien : courant

PUBLICATIONS

1. Huber JG, Gaillard J et Moulis J-M, NMR of *Chromatium vinosum* ferredoxin : evidence for structural inequivalence and impeded electron transfer between the two [4Fe-4S] clusters. Biochemistry, 1995, **34**, 194-205.
2. Guillard C, Pichat P, Huber G et Hoang-Van C, The GC-MS analysis of organic intermediates from the TiO_2 photocatalytic treatment of water contaminated by lindane (1α, 2α, 3β, 4α, 5α, 6β-hexachlorocyclohexane). J. of Adv. Oxidation technologies, 1996, **1**, 53-60.
3. Huber JG, Moulis J-M et Gaillard J, Use of ^1H longitudinal relaxation times in the solution structure of paramagnetic proteins. Applications to [4Fe-4S] proteins. Biochemistry, 1996, **35**, 12705-12711.
4. Kyritsis P, Huber JG, Quinkal I, Gaillard J et Moulis J-M, Intramolecular electron transfer between [4Fe-4S] clusters studied by PMR spectroscopy, Biochemistry, 1997, **36**, 7839-7846.

5. Bertini I, Dalvit C, Huber JG, Luchinat C et Piccioli M, ePHOGSY experiments on a paramagnetic protein : location of the catalytic water molecule in the heme crevice of the oxidized form of horse heart cytochrome c. FEBS letters, 1997, **415**, 45-48.

6. Banci L, Bertini I, Huber JG, Luchinat C et Rosato A, Partial orientation of oxidized and reduced cytochrome b_5 at high magnetic fields : magnetic susceptibility anisotropy contributions and consequences for protein solution structure determination, J. Am. Chem. Soc., 1998, **120**, 12903-12909.

7. Kyritsis P, Kümmerle R, Huber JG, Gaillard J, Guigliarelli B, Popescu C, Münck E et Moulis J-M, Unusual NMR, EPR, and Mossbauer properties of *Chromatium vinosum*, Biochemistry, 1999, **39**, 6335-6345.

8. Banci L, Bertini I, Huber JG, Spyroulias GA et Turano P, Solution structure of reduced horse heart cytochrome c, J. Biol. Inorg. Chem., 1999, **4**, 21-31.

9. Bertini I, Huber JG, Luchinat C et Piccioli M, Protein-hydration and location of water molecules in oxidized horse heart cytochrome c by (1)H NMR, J. Magn. Reson., 2000, **147**, 1-8.

10. Desvaux H, Huber JG, Brotin T, Dutasta J-P, Berthault P, Magnetization transfer from laser-polarized xenon to protons with spin-diffusion quenching, Chem Phys Chem, 2003, **4**, 384-387.

11. Dubois L, Parrès S, Huber JG, Berthault P, Desvaux H, Dynamics of xenon inside cavities as probed by NMR relaxation of dissolved laser-polarized xenon, J. Phys. Chem. B, 2004, **108**, 767-773.

12. Dubois L, Berthault P, Huber JG, Desvaux H, Mapping hydrophobic molecular regions using dissolved laser-polarized xenon NMR, Comptes Rendus Physique, 2004, **5**, 305-313.

13. Luo X, Chen Y, Huber JG, Zhang Y, Sinaÿ P, Diisobutylaluminum hydride as a molecular scalpel: the regioselective stripping of four methyl groups from permethylated b-cyclodextrin, Comptes Rendus Chimie, 2004, **7**, 25-28.

14. Huber JG, Dubois L, Desvaux H, Brotin T, Dutasta JP, Berthault P, NMR study of optically active monosubstituted cryptophanes and their interaction with xenon, J. Phys. Chem. A, 2004, **108**, 9608-9615.

15. Dubois L, Da Silva P, Landon C, Huber JG, Ponchet M, Vovelle F, Berthault P, Desvaux H, Probing hydrophobic cavities of lipid transfer protein from Nicotiana tabacum through Xenon-based NMR, J. Am. Chem. Soc., 2004, **126**, 15738-15746.

16. Chen Y, Huber JG, Zhang Y et Sinaÿ P, Regioselective One-step Synthesis of Hexahydroxy Permethylated β-Cyclodextrin and Unambiguous NMR Analysis, Comptes Rendus Chimie, 2005, **8**, 27-30.

17. Desvaux H, Dubois L, Huber G, Quillin ML, Berthault P, Matthews BW, Dynamics of xenon binding inside the hydrophobic cavity of pseudo wild-type bacteriophage T4 lysozyme explored through xenon-based NMR spectroscopy, J. Am. Chem. Soc., 2005, **127**, 11676-11683.

18. Berthault P, Huber G, Ha PT, Dubois L, Desvaux H, Guittet E, Study of the hydrophobic cavity of β-cryptogein through laser-polarized xenon NMR spectroscopy, ChemBioChem, 2006, **7**, 59-64.

19. Huber G, Brotin T, Dubois L, Desvaux H, Dutasta JP, Berthault P, Water soluble cryptophanes showing unprecedented affinity for xenon : candidates as NMR-based biosensors, J. Am. Chem. Soc., 2006, sous presse.

BREVETS

20. Gonzalez B, Huber JG, Piotto M, Renaud M, propriétaires Université d'Auvergne, BRUKER SA, Procédé et dispositif pour analyser l'état chimique de cellules vivantes par résonance magnétique nucléaire, 2000. Brevets n°FR2815357, EP1410055, US20030199751, WO0231523.

21. Gonzalez B, Huber JG, d'Auriol L, propriétaires Metabolic Explorer, Bruker SA, Dispositif pour l'analyse spectroscopique RMN in vivo des métabolites d'un milieu de culture, 2000. Brevets n° FR2816713, EP 1342097, WO0241021.

22. Huber JG, Gonzalez B, d'Auriol L, propriétaire Metabolic Explorer, Caractérisation de caoutchoucs et dérivés de caoutchoucs par RMN HRMAS, 2001. Brevets n° FR2821430, WO02068946-A1.

PUBLICATIONS EFFECTUEES DANS LE CADRE DE CONGRES

1. Huber JG, J.-M. Moulis et J. Gaillard, (EENC), Paris, 1996.
2. Bertini, C. Dalvit, Huber JG, C. Luchinat et M. Piccioli, *Chianti Workshop*, san Miniato (Italie), 1997.
3. Rosato A, Huber JG, Banci L, Bertini I, et Luchinat C, Conference on Coordination chemistry (ICCC), Florence (Italie), 1998.
4. Huber JG, I. Bertini, C. Luchinat et M. Piccioli, International Conference on Coordination chemistry (ICCC), Florence (Italie), 1998.
5. Huber JG, Franco-German NMR conference, Obernai, poster, 1998.
6. Borel M, Lafarge D, Grenet C, Huber JG, Veyre A, Madelmont JC, XIXth International Conference on Magnetic Resonance in Biological Systems, 2000.
7. Morvan D, Huber JG, Kwiatowski F, Madelmont JC, VIIIth meeting of the International Society for Magnetic Resonance in Medicine, 2000.
8. Study of xenon-cryptophane binding using laser-polarized 129 xenon NMR, Huber JG, Dubois L, Brotin, T, Dutasta, JP, Berthault P, EENC 2004.
9. Study of cage-molecules for biosensing using laser-polarised xenon NMR, Huber JG, Desvaux H, Dubois L, Brotin, T, Dutasta, JP, Berthault P, GERM 2006.

COMMUNICATIONS ORALES, SEMINAIRES, CONGRES

1. Luebeck (Allemagne), 1998.
2. Journée thématique RMN et métalloprotéines, Grenoble, 1998.
3. Huber JG, Journée thématique RMN et métalloprotéines ; Grenoble, communication orale, 1998.
4. BIP IBSM, Marseille, 1999.
5. "Apports du xénon polarisé par laser à la caractérisation de cavités hydrophobes par RMN", RMN biologique et enjeux du vivant, Clermont-Ferrand, 12 mars 2003.
6. 'Utilisation du 129Xe en RMN à haute résolution comme sonde hydrophobe et source de polarisation intense', GDR 2144, 8 décembre 2003.
7. Caractérisation de cavités hydrophobes par RMN du xénon, CEA Grenoble, séminaire invité, 22 juin 2004.