



**HAL**  
open science

# Développement de nouvelles sondes pour l'analyse par RMN des fonctions cellulaires des biomolécules

Laetitia Fernandes

► **To cite this version:**

Laetitia Fernandes. Développement de nouvelles sondes pour l'analyse par RMN des fonctions cellulaires des biomolécules. Chimie analytique. Université Sorbonne Paris Cité, 2015. Français. NNT : 2015USPCB095 . tel-01535676

**HAL Id: tel-01535676**

**<https://theses.hal.science/tel-01535676v1>**

Submitted on 9 Jun 2017

**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 Descartes  
Ecole doctorale MTCI  
Médicament Toxicologie Chimie et Imagerie

*Laboratoire de Chimie Biochimie Pharmacologiques et Toxicologiques*  
*45, rue des Saints-Pères*  
*75006 Paris*

**Développement de nouvelles sondes  
pour l'analyse par RMN  
des fonctions cellulaires des biomolécules**

Par Laetitia FERNANDES

Thèse de doctorat en Chimie Analytique  
Dirigée par Professeur Paul Vasos et Dr Fatiha Kateb

Présentée et soutenue publiquement le 24 Septembre 2015

Devant un jury composé de :

Daniel <b>Abergel</b>	<i>DR, ENS, Paris</i>	Rapporteur
Ewen <b>Lescop</b>	<i>Chercheur CNRS, Gif sur Yvette, Paris</i>	Rapporteur
Laurence <b>Le Moyec</b>	<i>PR, Université d'Evry Val d'Essonne, Paris</i>	Examinatrice
Carine <b>Tisné</b>	<i>DR, Université Paris Descartes, Paris</i>	Examinatrice
Fatiha <b>Kateb</b>	<i>MC, LCBPT UMR8601, Paris</i>	Co-directrice de thèse
Paul <b>Vasos</b>	<i>PR, LCBPT UMR8601, Paris</i>	Directeur de thèse
Jens <b>Dittmer</b>	<i>PR, Université du Maine, Paris</i>	Membre invité



Copyright  
Laetitia Fernandes, 2015  
All rights reserved



Je dédie ces travaux de thèse à tous mes proches qui m'ont soutenu le long de ces trois années et tout particulièrement à ma maman Clotilde, mon papa Jean Manuel et à mon Chou.



## Remerciements

---

*Je tenais avant tout à remercier mes directeurs de thèse le Professeur Paul Vasos et le Docteur Fatiha Kateb, pour m'avoir permis de réaliser ces travaux de thèses au sein de leur équipe.*

*Je tiens également à remercier la directrice du laboratoire d'accueil (UMR 8601), le Dr Francine Acher pour avoir su m'écouter, me soutenir pendant ces trois années.*

*Je tiens à témoigner toute ma gratitude aux membres du jury, en particulier à mes deux rapporteurs scientifiques, le Dr Ewen Lescop et le Dr Daniel Abergel, pour avoir jugé avec un œil averti mes travaux de thèse. Je remercie également mes examinateurs de thèse, le Pr Laurence Le Moyec, le Dr Carine Tisné et le Pr Jens Dittmer, d'avoir accepté de juger mon travail.*

*Je remercie toutes les personnes présentes au laboratoire de chimie biologie et pharmacologiques toxicologiques pour leur accueil, leur présence, leur soutien, leur sourire qui m'ont réconfortée pendant ces trois années.*

*Je ne peux oublier de remercier tous les étudiants, doctorants, post doctorants que j'ai pu croiser au cours de ma thèse, ceux avec qui j'ai partagé les pauses déjeuners, les pauses café, ceux avec qui je suis allée décompresser autour d'un verre après le boulot.*

*Je remercie tout particulièrement mon équipe les membres permanents de mon équipe, Nathalie, Gildas, Maxime et Riccardo ainsi que les stagiaires, Mickaël, Anne, Moushira, David, Félix, Romain, Charles, Laurent, Margot, Sarah et Anni pour votre présence, votre soutien, vos encouragements, vos gâteaux, les goûters partagés, vos maitrises culinaires (je n'oublierai jamais le fraisier soi-disant « raté » de Fatiha... un pur délice !). Merci Nathalie, Carole, Laura, Fatiha, Sandrine pour tous ces moments de détente entre midi et deux... à la rumerie. Merci Maxime pour ta bonne humeur, tes blagues et tes nombreux sushis partagés.*

*Un grand merci à Fatiha pour son encadrement, son soutien, ses conseils, sa patience qui ont été indispensables pendant ces années.*

*En dehors de mon équipe, il y a de nombreuses personnes que je souhaiterai remercier individuellement.*

*Je commence par le plus important, Abdou, sans toi cette thèse n'aurait jamais été pareille, bien plus qu'un collègue, j'ai trouvé en toi un ami sur qui j'ai pu compter, raconter tous mes déboires, je te remercie pour ta présence, ton sourire et sans oublier tes oranges !*

*Je remercie Laura, pour son aide précieuse, la paperasse administrative n'aurait pas été aussi facile sans toi. Merci aussi à toi et Kahina pour m'accompagner aux séances de sport.*

*Je remercie également Aude et Joselaine pour votre aide, votre bonne humeur, pour tout ce que vous avez organisé. Un régal pour les papilles ton punch, Joselaine !*

*Un immense merci à Maryse pour sa gentillesse, sa patience et son enseignement de la biochimie. Ces moments partagés ont été des bouffées d'air frais.*

*Je remercie aussi tous les doctorants qui sont aussi présents en dehors du laboratoire, Mickaël, Sandy, Christine et Laura.*

*Pendant cette thèse, j'ai réalisé 192 h de monitorat qui ont été pour moi une initiation à l'enseignement, et que je recommencerai avec grand plaisir. Merci à mes étudiants pour leurs questions, pour m'avoir donné des fous rires, ou d'avoir contribué à ma perte de cheveux pour leurs magnifiques copies, à ma prise de poids avec leur chocolat...*

*Je remercie bien plus encore Karine, Delphine, Affouchata, Abdel et tout particulièrement Delphine (DO) pour ces corrections juste « topissimes », ces nombreux conseils...*

*Je tiens à remercier tous mes amis qui m'ont soutenue :*

*Mathieu pour ces longues heures à m'attendre et à m'écouter râler ou à se moquer de ma poisse légendaire.*

*Aurélië, pour son amitié éternelle et sincère.*

*Myriam, pour tout ce que tu m'as appris, la confiance et l'amitié que tu m'as donnée depuis quelques années.*

*Adeline pour son sourire, tous ces moments de folie partagés.*

*Dodo pour être présent et fidèle à ton amitié malgré la distance.*

*Fanny pour ta patience à me supporter, surtout pendant ces deux ans où je n'ai pas été toujours rose.*

*Merci à toutes les autres personnes qui sont présentes et importantes dans ma vie.*

*Et le plus important et le plus grand des merci à mes proches que j'aime fort, Maman et Papa pour tout ce que vous avez fait, sacrifié afin que je devienne la personne que je suis.*

*Merci à Mamie Idilia et Papi Jaime, Mamie Maria et Papi Joao pour leur amour.*

*Merci à Antonio, Conception, Elisabeth et Cindy ainsi que leurs proches pour être là pour moi, vous êtes ma famille de cœur.*

*Merci à mon Chou pour son soutien, son amour et sa patience pour me supporter.*

*Et enfin merci à tous ceux qui me sont chers et que je n'ai pu citer.*

# Sommaire

---

<b>Remerciements.....</b>	<b>5</b>
<b>Liste des abréviations.....</b>	<b>13</b>
<b>Chapitre 1 Introduction à la Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) à l'état liquide.....</b>	<b>13</b>
<b>Chapitre 2 Systèmes Biologiques .....</b>	<b>14</b>
Protéine c-Src .....	14
Protéine IkBa.....	15
<b>Chapitre 3 Etude de l'extrémité N-terminale de c-Src .....</b>	<b>16</b>
<b>Chapitre 4 Analyses RMN dans les cellules.....</b>	<b>16</b>
<b>Introduction .....</b>	<b>17</b>
<b>I. Introduction à la résonance magnétique nucléaire (RMN) à l'état liquide .....</b>	<b>19</b>
<b>A. Généralités .....</b>	<b>19</b>
<b>1. Historique .....</b>	<b>19</b>
<b>2. Notions base en RMN.....</b>	<b>21</b>
a. Définitions.....	21
b. Notions de base en RMN.....	23
<b>B. RMN 1D et 2D .....</b>	<b>28</b>
<b>1. Généralités RMN 1D .....</b>	<b>28</b>
<b>2. Généralités RMN 2D .....</b>	<b>28</b>
<b>3. L'expérience TOCSY .....</b>	<b>30</b>
<b>4. L'expérience INEPT et HSQC .....</b>	<b>31</b>
<b>C. Relaxation RMN.....</b>	<b>33</b>
<b>1. Généralités.....</b>	<b>33</b>
<b>2. La relaxation longitudinale : <math>T_1</math>.....</b>	<b>34</b>
<b>3. La relaxation transversale : <math>T_2</math> .....</b>	<b>36</b>
<b>D. Mécanismes d'interaction et relaxation .....</b>	<b>38</b>
<b>E. Les états et cohérences de spins à longs temps de vie .....</b>	<b>39</b>
<b>1. Long-Lived States (LLS).....</b>	<b>39</b>
<b>2. Long-Lived Coherences (LLC).....</b>	<b>42</b>

<b>F. Polarisation dynamique nucléaire (<i>dynamic nuclear polarization-DNP</i>).....</b>	<b>45</b>
<b>1. Généralités.....</b>	<b>45</b>
<b>2. Principe.....</b>	<b>46</b>
<b>3. Agents polarisants.....</b>	<b>47</b>
<b>G. Objectifs .....</b>	<b>48</b>
<b>II. Systèmes biologiques.....</b>	<b>51</b>
<b>A. Domaine N-terminal de la protéine Src issue de Rous Sarcoma Virus (RSV) .....</b>	<b>51</b>
<b>1. Historique et découvertes lié à c-Src.....</b>	<b>53</b>
<b>2. Fonction et organisation de la protéine c-Src .....</b>	<b>54</b>
a. Fonctions de c-Src dans la cellule .....	54
b. Organisation de c-Src .....	56
<b>3. Extrémité N-terminale .....</b>	<b>64</b>
a. Composition de l'extrémité N-terminale.....	64
b. Les découvertes sur l'extrémité N-terminale.....	66
<b>4. Mécanisme cellulaire .....</b>	<b>69</b>
a. Les différentes conformations .....	70
b. L'activation de c-Src .....	71
<b>5. Problématique.....</b>	<b>72</b>
<b>B. Protéine IκBα.....</b>	<b>74</b>
<b>1. Introduction .....</b>	<b>74</b>
<b>2. Facteur de transcription NF-κB.....</b>	<b>75</b>
a. Structure de NF-κB.....	75
b. Activation de NF-κB .....	76
c. Gènes cibles.....	78
d. NF-κB et les cancers.....	78
<b>3. Les protéines inhibitrices IκBs .....</b>	<b>79</b>
a. Protéines inhibitrices .....	79
b. Structure de IκBα.....	79
c. IκBα kinase : IKK.....	81
d. Activation et dégradation de IκBα.....	83
<b>4. Problématique .....</b>	<b>84</b>
<b>III. Etude de l'extrémité N-terminale de c-Src.....</b>	<b>85</b>
<b>A. Production de l'extrémité N-terminale la protéine c-Src .....</b>	<b>85</b>
<b>1. Choix de la souche bactérienne .....</b>	<b>85</b>

2.	<b>Plasmide</b> .....	<b>86</b>
3.	<b>L'extrémité N-terminale de la protéine c-Src - USrc</b> .....	<b>88</b>
4.	<b>Synthèse protéique de USrc</b> .....	<b>88</b>
	a. Expression de la protéine USrc marquée en <sup>15</sup> N .....	88
	b. Purification de la protéine c-Src .....	89
	c. Analyse par un gel électrophorèse SDS-PAGE.....	90
	d. Dosage de la protéine c-Src .....	92
<b>B.</b>	<b>Analyse du domaine USrc</b> .....	<b>93</b>
1.	<b>Analyse de la séquence primaire</b> .....	<b>93</b>
2.	<b>Attribution des H<sup>α</sup></b> .....	<b>94</b>
3.	<b>Etude de relaxation : mesures de T<sub>1</sub> et T<sub>LLS</sub></b> .....	<b>97</b>
	a. Mesure de T <sub>1</sub> et T <sub>LLS</sub> sur le dipeptide Ala-Gly .....	98
	b. Mesure sur l'Ubiquitine.....	100
	c. Mesure sur USrc .....	101
4.	<b>Les protons des sérines en tant que sondes RMN</b> .....	<b>104</b>
	a. L'échange chimique .....	105
	b. Analyse des LLS de la sérine à différents pH .....	107
5.	<b>Etude LLC</b> .....	<b>109</b>
	a. Mise au point sur Ala-Gly .....	109
	b. Application sur l'Ubiquitine.....	112
	c. Application sur USrc .....	114
<b>C.</b>	<b>Conclusion générale sur l'analyse de USrc</b> .....	<b>115</b>
<b>IV.</b>	<b>Analyses RMN dans les cellules</b> .....	<b>117</b>
<b>A.</b>	<b>Généralités</b> .....	<b>117</b>
<b>B.</b>	<b>Électroporation</b> .....	<b>119</b>
1.	<b>Principes</b> .....	<b>119</b>
2.	<b>Les composés à électroporer</b> .....	<b>120</b>
	a. IκBα et IKKβ.....	120
	b. Alexa Fluor 568.....	120
3.	<b>Analyses d'IκBα en présence de lysats cellulaires</b> .....	<b>121</b>
4.	<b>La microscopie à fluorescence</b> .....	<b>124</b>
5.	<b>Analyses RMN</b> .....	<b>125</b>
	a. Alexa Fluor 568.....	125
	b. IκBα.....	129
6.	<b>Conclusion</b> .....	<b>133</b>

<b>C. Polarisation Dynamique Nucléaire (DNP)</b> .....	<b>135</b>
<b>1. Introduction</b> .....	<b>135</b>
<b>2. Etude de la conversion du pyruvate-lactate</b> .....	<b>136</b>
<b>3. Les cellules murines et les échantillons</b> .....	<b>138</b>
<b>4. Hyperpolarisation</b> .....	<b>139</b>
<b>5. Analyse RMN</b> .....	<b>139</b>
<b>6. Essai sur la protéine USrc non marquée</b> .....	<b>143</b>
<b>Conclusion</b> .....	<b>145</b>
<b>Annexes</b> .....	<b>149</b>
<b>A. Mode opératoire détaillé de la synthèse protéique d'USrc</b> .....	<b>149</b>
<b>1. Préparation du milieu et des tampons</b> .....	<b>149</b>
a. Préparation du milieu M9 marqué : .....	149
b. Préparation du tampon de lyse : L .....	149
c. Préparation du tampon de rinçage : R .....	149
d. Préparation du tampon d'éluion : E.....	150
e. Préparation du tampon pour l'analyse RMN.....	150
<b>2. Transformation des bactéries Rosetta BL21</b> .....	<b>150</b>
<b>3. Expression de la protéine USrc marquée <sup>15</sup>N</b> .....	<b>150</b>
<b>4. Purification du premier culot de bactéries</b> .....	<b>151</b>
a. Préparation des produits pour la lyse des bactéries .....	151
b. Lyse des bactéries.....	151
c. Préparation de la colonne Strep-Tactin® .....	152
d. Purification de la protéine .....	152
e. Gel électrophorèse SDS-page (sodium dodecyl sulfate) des fractions .....	152
f. Analyse par RMN.....	153
g. Dosage de la protéine USrc exprimée .....	153
<b>B. Mode opératoire de la préparation des tampons pour l'étude de la sérine</b> .....	<b>155</b>
<b>1. Préparation des différentes solutions tampon</b> .....	<b>155</b>
a. Tampon acétate 50 mM (CH <sub>3</sub> COOH / CH <sub>3</sub> COO <sup>-</sup> ) pH = 5 .....	155
b. Tampon acétate 50 mM (CH <sub>3</sub> COOH / CH <sub>3</sub> COO <sup>-</sup> ) pH = 4 .....	155
c. Tampon phosphate 50 mM (H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> <sup>-</sup> / HPO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> ) pH = 7 .....	155
d. Tampon phosphate 50 mM (H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> <sup>-</sup> / HPO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> ) pH = 6.....	155
e. Tampon Tris 50 mM (C <sub>4</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>3</sub> ) pH = 8 .....	155
f. Tampon Tris C <sub>4</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>3</sub> 50 mM pH = 9 .....	155

g.	Tampon Carbonate 50 mM ( $\text{HCO}_3^- / \text{CO}_3^{2-}$ ) pH = 11 .....	156
h.	Tampon Carbonate 50 mM ( $\text{HCO}_3^- / \text{CO}_3^{2-}$ ) pH = 10.....	156
<b>2.</b>	<b>Préparation des échantillons de sérine (20 mM).....</b>	<b>156</b>
<b>C.</b>	<b>Mode opératoire détaillé de l'électroporation .....</b>	<b>157</b>
<b>1.</b>	<b>Préparation des composés à électroporer .....</b>	<b>157</b>
a.	Protéine IKB $\alpha$ non Phosphorylée à 150 $\mu\text{M}$ .....	157
b.	Protéine IKB $\alpha$ diPhosphorylée à 150 $\mu\text{M}$ .....	157
c.	Fluorochrome Alexa fluor 564 <sup>®</sup> à 25 $\mu\text{M}$ :.....	157
d.	Préparation de l'échantillon GFP à 0,1pM .....	157
<b>2.</b>	<b>Préparation des cellules à électroporer .....</b>	<b>157</b>
<b>3.</b>	<b>Electroporation dans les cellules HepG2 .....</b>	<b>158</b>
<b>4.</b>	<b>Spectres 1D <math>^1\text{H}</math> acquis lors des expériences d'électroporation .....</b>	<b>159</b>
a.	IKB $\alpha$ .....	159
b.	IKK $\beta$ .....	163
	<b>Bibliographie.....</b>	<b>165</b>
	<b>Publications .....</b>	<b>173</b>



# **Liste des abréviations**



# Liste des abréviations

---

## Chapitre 1 Introduction à la Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) à l'état liquide

<b>Ala-Gly</b>	Alanine-Glycine	
<b>COSY</b>	Correlation Spectroscopy	
<b>DD</b>	Dipôle-Dipôle Interaction	Interaction Dipôle-Dipôle
<b>DNP</b>	Dynamic Nuclear Polarization	Polarisation Dynamique Nucléaire
<b>FID</b>	Free Induction Decay	Signal de precession libre
<b>HSQC</b>	Heteronuclear Single-Quantum Correlation	
<b>INEPT</b>	Insensitive Nuclei Enhanced by Polarization Transfer	
<b>LLC</b>	Long-Lived Coherences	Cohérences à longs temps de vie
<b>LLS</b>	Long-Lived State	Etats de spins à longs temps de vie
<b>RF</b>	Radiofrequence	Radiofréquence
<b>RMN</b>	Nuclear Magnetic Resonance	Résonance Magnétique Nucléaire
$T_1$	Spin-lattice relaxation time	Temps de relaxation longitudinale
$T_2$	Spin-spin relaxation time	Temps de relaxation transversale
<b>TF</b>	Fourier Transform	Transformée de Fourier
$T_{LLS}$	LLS relaxation time	Temps de relaxation LLS
<b>TOCSY</b>	Total Correlation Spectroscopy	

## Chapitre 2 Systèmes Biologiques

### Protéine c-Src

<b>ADN</b>	Deoxyribonucleic Acid	Acide DésoxyriboNucléique
<b>APP</b>	Amyloid Precursor Protein	Protéine précurseur de l'amyloïde
<b>ATP</b>	Adenosine TriPhosphate	Adénosine TriPhosphate
<b>Cas</b>	Crk-associated substrate	
<b>CBL</b>	Ubiquitin Ligase E3	Ubiquitine Ligase E3
<b>Cdk</b>	Cyclin-dependent kinase	
<b>CoA</b>	Co-enzyme A	Co-enzyme A
<b>CSK</b>	c-Src Tyrosine Kinase	c-Src tyrosine Kinase
<b>c-Src</b>	Cellular Sarcoma	Sarcome cellulaire
<b>EGFR</b>	Epidermal Growth Factor Receptor	Récepteurs de facteurs de croissance épidermique
<b>FAK</b>	Focal Adhesion Kinase	Kinase d'Adhésion Focale
<b>GAP</b>	GTPase-activating protein	Protéine activatrice GTPase
<b>GFR</b>	Growth Factor Receptor	Récepteurs de Facteurs de Croissance
<b>HcK</b>	Hematopoietic cells Kinase	Kinase de cellules hématopoïétiques
<b>IDP</b>	Intrinsically Disordered Protein	Protéine Intrinsèquement Désordonnée
<b>IDR</b>	Intrinsically Disordered Region	Région Intrinsèquement Désordonnée
<b>IκBα</b>	Inhibitor of NF-κB	Inhibiteur de NF-κB
<b>LcK</b>	Lymphoid cells Kinase	Kinase des cellules Lymphoïdes
<b>MAPK</b>	Mitogen-activated Protein Kinase	Protéine Kinase Activée par les mitogènes
<b>MEK</b>	Mitogen-activated Protein Kinase	Protéine Kinase 1 Activée par les mitogènes
<b>MNT</b>	Protein N-Myristoyl Transferase	
<b>myr</b>	Myristoyl	Myristoyle
<b>PDB</b>	Protein Data Bank	Banque de donnée de protéines
<b>PDGF</b>	Platelet-Derived Growth Factor	Facteur de croissance dérivé de plaquettes
<b>PI3-K</b>	Phosphoinositide 3-kinase	Phosphoinositide 3-kinase
<b>PPI</b>	Anion Pyrophosphate	Anion Pyrophosphate
<b>PTK</b>	Protein Tyrosine Kinase	Protéine Tyrosine Kinase
<b>PTP</b>	Protein Tyrosine Phosphatase	Protéine Tyrosine Phosphatase
<b>RSV</b>	Rous Sarcoma Virus	Rous Sarcome Virus
<b>SH</b>	Src Homology Domain	Domaine d'Homologie de Src

<b>STAT3</b>	Signal transducer and activator of transcription 3	Transducteur du signal et Activateur de la transcription 3
<b>TYR</b>	Tyrosine	Tyrosine, Y
<b>UBLR</b>	Unique Binding Lipid Region	Région Unique de Liaison Lipidique
<b>USrc</b>		Extrémité N-terminale de c-Src

### **Protéine I $\kappa$ B $\alpha$**

<b>ANK</b>	Ankyrin	Ankyrine
<b>CC</b>	Coiled Coil	
<b>DD</b>	Death Domain	
<b>HLH</b>	Helix Loop Helix	Hélice boucle Hélice
<b>IKK</b>	I $\kappa$ B $\alpha$ Kinase	I $\kappa$ B $\alpha$ Kinase
<b>LZ</b>	Leucine Zipper	
<b>NBD</b>	NEMO Binding Domain	Domaine de liaison NEMO
<b>NEMO</b>	NF- $\kappa$ B Essential Modulator	Modulateur essentiel de NF- $\kappa$ B
<b>NF-<math>\kappa</math>B</b>	Nuclear Factor kappa B	Facteur Nucléaire Kappa B
<b>NLS</b>	Nuclear Localization Sequence	Signalisation de Localisation Nucléaire
<b>PEST</b>	Proline Glutamine Serine Threonine	Proline Glutamine Serine Thréonine
<b>Rel</b>	Reticuloendotheliosis	Réticuloendotheliose
<b>RHD</b>	Rel Homology Domain	Domaine Homologie Rel
<b>TA</b>	Transcription Activator	Activateur de Transcription
<b>TNF</b>	Tumor Necrosis Factor	Facteur de Nécrose Tumorale
<b>ZF</b>	Zinc Finger	Doigts de zinc

### Chapitre 3 Etude de l'extrémité N-terminale de c-Src

<b>ARN</b>	Ribonucleic Acid	Acide Ribonucléique
<b>BCA</b>	Bicinchoninic acid assay	Test Acide Bicinchonique
<b>BSA</b>	Bovine serum albumin	Albumine de sérum bovin
<b>DO</b>	Optical Density	Densité Optique
<b>FT</b>	Flow Through	
<b>IPTG</b>	Isopropyl $\beta$ -D-1-thiogalactopyranoside	Isopropyl- $\beta$ -D-1-thiogalactopyranoside
<b>MES</b>	2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid	
<b>PMSF</b>	PhenylMethylSulfonyl Fluoride	Fluorure de phénylméthylsulfonyle
<b>rpm</b>	Revolution per minute	Tours par minute
<b>SDS</b>	Sodium Dodecyl Sulfate	Dodécylsulfate de sodium
<b>USrc</b>		Extrémité N-terminale (SH4 et domaine unique)
<b>WG</b>	WaterGate	
<b>1N</b>	1 normal acid or base	

### Chapitre 4 Analyses RMN dans les cellules

<b>EMEM</b>	Eagle's Minimum Essential Medium	
<b>GFP</b>	Green Fluorescent Protein	Protéine Fluorescente verte
<b>Km</b>	Michaelis constant	Constante de Michaelis
<b>Lac</b>	Lactate	Lactate
<b>LDH</b>	Lactate dehydrogenase	Lactate Déshydrogénase
<b>MTC4+</b>	Monocarboxylate Transportor 4	Transporteur Monocarboxylate 4
<b>NADH</b>	Nicotinamide Adenine Dinucleotide H <sup>+</sup>	Nicotinamide Adénine Dinucléotide H <sup>+</sup>
<b>PTFE</b>	Polytetrafluoroethylene	Polytétrafluoroéthylène
<b>Pyr</b>	Pyruvate	Pyruvate
<b>Res-</b>		Respiratoire déficitaire

# **Introduction**



# Introduction

---

La Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) est à la base des explications utilisées en chimie, biochimie, médecine. Une des clefs de cette technique est sa capacité à étudier et à déterminer la structure de biomolécules : métabolites, protéines, ADN ou ARN. La plupart des études RMN publiées jusqu'ici ont été réalisées *in vitro*, dans des solutions tampons concentrées, toutefois les biomolécules peuvent avoir une structure et une dynamique différentes lorsqu'elles sont présentes dans leur environnement naturel, *i.e.*, la cellule. Depuis quelques années, l'analyse par RMN des biomolécules directement dans les cellules (*in-cell NMR*) se développe surtout afin de mieux comprendre le comportement des protéines, que ce soit leur structure, leur dynamique, mais aussi les interactions qu'elles peuvent avoir avec les autres biomolécules présentes dans la cellule.

Les difficultés majeures de l'utilisation de la RMN dans les cellules sont, d'une part, la faible intensité des signaux due à la faible concentration physiologique des protéines dans la cellule, et d'autre part, l'environnement visqueux de la cellule, qui accélère la relaxation transversale de la protéine. Ceci se traduit sur les spectres par un élargissement des raies.

Ces travaux de thèse se sont conclus par le développement d'un protocole adapté à l'étude de biomolécules dans un milieu complexe : la cellule.

Pour cela, afin d'étudier le comportement *in cell* de biomolécules, nous avons choisi une protéine modèle issu de la protéine IκBα. Ce dernier a tout d'abord été mis en présence de lysat cellulaire, ou incubé avec des cellules vivantes, électroporées ou non. Le but des expériences est d'améliorer le suivi par RMN des biomolécules au sein de la cellule.

De manière complémentaire, nous avons tenté de développer et d'utiliser des méthodes RMN adaptées à l'étude des protéines dans la cellule. La Polarisation Dynamique Nucléaire (DNP), dont les applications en RMN du liquide (dissolution-DNP) se développent de plus en plus<sup>1,2,3</sup>, pourrait permettre de pallier au manque de sensibilité. Ainsi au cours de ma thèse, nous avons essayé de mettre au point un prototype de montage de dissolution-DNP, dont les premiers résultats obtenus concernant le suivi de la conversion du pyruvate en lactate seront discutés.

---

<sup>1</sup> Chen et al., « Protein Folding Studied by Dissolution Dynamic Nuclear Polarization », *Angewandte Chemie*, vol. 125, no 35, 26 août 2013.

<sup>2</sup> Loening et al., « Solution-state dynamic nuclear polarization at high magnetic field », *Journal of the American Chemical Society*, vol. 124, no 30, 31 juillet 2002.

<sup>3</sup> Günther, « Dynamic nuclear hyperpolarization in liquids », *Topics in Current Chemistry*, vol. 335, 2013.

Par ailleurs, l'utilisation des états à longs temps de vie (*Long-Lived States* ou *LLS*) devrait permettre d'améliorer le rapport signal/bruit<sup>4</sup>, tandis que celle des cohérences à longs temps de vie (*Long-Lived Coherence* ou *LLC*) devrait, quant à elle, permettre d'améliorer la résolution<sup>5</sup>.

Au cours de ma thèse, nous avons cherché à adapter l'utilisation des LLS à un système complexe tel qu'une protéine, ainsi qu'à mettre au point l'utilisation des LLC's d'abord sur un dipeptide simple puis dans le cas d'un domaine protéique plus complexe.

Ce manuscrit comporte quatre parties : dans un premier chapitre, les bases de RMN seront présentées. Ce chapitre comporte la présentation des méthodes de mesure des temps de relaxation longitudinale et transversale de l'aimantation classiquement utilisés pour l'étude de la dynamique des protéines. Je présenterai également les états à longs temps de vie et l'intérêt qu'ils peuvent avoir dans l'étude des systèmes qui nous intéressent. Enfin une brève introduction sera faite sur la dissolution-DNP.

Les différents systèmes biologiques utilisés pendant mes travaux de recherche seront présentés dans un second chapitre. Le premier système correspond à l'extrémité N-terminale de la protéine c-Src. Ce domaine a la particularité d'être partiellement désordonné *in vitro* et d'interagir avec la membrane cellulaire. Le deuxième système étudié est une protéine issue de la protéine I $\kappa$ B $\alpha$  qui intervient dans la réponse cellulaire suite à un stimulus extérieur se traduisant par une réaction inflammatoire. La séquence de cette protéine contient deux sérines phosphorylables qui interviennent lors de cette réponse et jouent donc un rôle clef dans l'inflammation. Nous avons tenté de suivre la phosphorylation de ces deux sérines dans les cellules par RMN. Ce modèle a été utilisé pour mettre au point un protocole d'analyse de protéines, faisant intervenir la technique d'électroporation pour les faire pénétrer à l'intérieur de la cellule.

Les résultats obtenus lors de différentes expériences réalisées pendant mes travaux de thèse seront exposés dans les chapitres 3 et 4.

---

<sup>4</sup> Carravetta et Levitt, « Long-Lived Nuclear Spin States in High-Field Solution NMR », *Journal of the American Chemical Society*, vol. 126, no 20, 1 mai 2004.

<sup>5</sup> Sarkar et al., « Long-lived coherences for homogeneous line narrowing in spectroscopy », *Physical Review Letters*, vol. 104, no 5, 5 février 2010.

# **Chapitre I**



# I. Introduction à la résonance magnétique nucléaire (RMN) à l'état liquide

---

Ce chapitre est consacré à une introduction générale concernant la RMN à l'état liquide. Il s'agit d'introduire les notions de base de la RMN 1D et 2D ainsi que des méthodes de relaxation utilisées pendant les travaux de recherches de cette thèse. Les notions abordées ci-après sont basées sur plusieurs ouvrages<sup>6,7,8</sup> et EMagRes, encyclopédie numérique, dédiés à la RMN<sup>9</sup>.

## A. Généralités

La Résonance Magnétique Nucléaire est une technique d'analyse et d'étude de molécules placées dans un champ magnétique. Seuls certains noyaux atomiques, tels que  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ ,  $^{31}\text{P}$ , constituants de la molécule étudiée sont observables par cette technique.

### 1. Historique

La RMN a fait l'objet de nombreux prix Nobel au XX<sup>e</sup> siècle. En 1922, deux physiciens allemands, Stern et Gerlach, ont prouvé l'existence des moments magnétiques quantifiés grâce à une expérience qui consistait à faire passer un faisceau d'atomes d'argent dans un champ magnétique non uniforme. Un résultat non attendu en sortit, le faisceau fut dévié de sa trajectoire et se sépara en deux (Figure 1) illustrant alors la notion de spin et la quantification des moments magnétiques.

---

<sup>6</sup> Hore, Nuclear Magnetic Resonance, 1 edition, Oxford ; New York : Oxford University Press, 13 juillet 1995, 96 p.

<sup>7</sup> Hore et al., NMR: The Toolkit, 1 edition, Oxford ; New York : Oxford University Press, 16 novembre 2000, 85 p.

<sup>8</sup> Keeler, Understanding NMR Spectroscopy, Second Edition, 2 edition, Chichester, U.K : Wiley, 24 mai 2010, 526 p.

<sup>9</sup> Cavadini et al., « Long-Lived States and Coherences for Line Narrowing, DNP, and Study of Interactions », in EMagRes.; John Wiley & Sons, Ltd, 2007

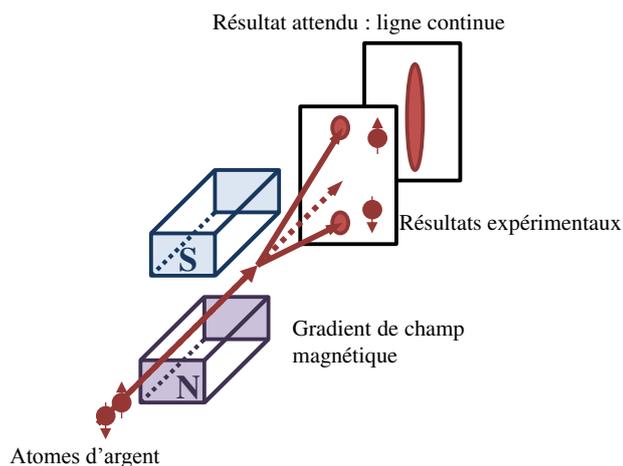


Figure 1 - Expérience de Stern et Gerlach<sup>10</sup>

Ce n'est qu'en 1938, que les interactions magnétiques des noyaux avec une onde électromagnétique extérieure ont été mises en évidence par Isidor Rabi, physicien américain, qui développa une technique permettant de mesurer des moments magnétiques à partir de l'appareillage de Stern et Gerlach. La différence est qu'il utilisa trois champs magnétiques. Les faisceaux d'atomes utilisés subissent alors des déviations dues à l'irradiation à des fréquences précises (« fréquences de Larmor »). Cette découverte lui valut le prix Nobel de physique en 1944<sup>11</sup>.

Quelques années plus tard, en 1946, les américains Bloch et Purcell, réalisèrent les premières expériences de magnétisme nucléaire par « induction magnétique » (Bloch) et « résonance » (Purcell) et partagèrent le prix Nobel de physique en 1952<sup>12</sup>.

A partir de la découverte du phénomène de Résonance Magnétique Nucléaire (RMN), de nombreux théoriciens et physiciens firent des avancées considérables dans ce domaine. Hahn, physicien américain, développa, en 1950, la théorie « des échos de spin » qui est à la base des techniques multi-impulsionnelles<sup>13</sup>. Dans la même année, Proctor et Dickinson ont mis en évidence le déplacement chimique<sup>14</sup>. En 1953, Hahn et Maxwell firent une découverte fondamentale en RMN, l'effet d'échange chimique sur les spectres RMN. Et enfin, en 1960, Ernst, célèbre chimiste suisse, fit une avancée majeure : l'utilisation de l'excitation sur des plages de fréquences étendues suivie de transformées de Fourier pour obtenir un spectre exploitable. En 1975, Ernst réalisa une première expérience à deux dimensions par spectroscopie RMN en analysant les données par une double transformation de Fourier. Il permit ainsi d'étendre l'analyse RMN à des échantillons beaucoup plus complexes, et obtint le prix Nobel de chimie en 1991. Les travaux conduits par Wultrich en 1980 lui ont permis d'utiliser la RMN pour les protéines et d'obtenir le prix nobel de chimie en 2002.

<sup>10</sup> Gerlach et Stern, « Der experimentelle Nachweis der Richtungsquantelung im Magnetfeld », Zeitschrift für Physik, vol. 9, no 1, 1 décembre 1922

<sup>11</sup> Shampo et al., « Isidor Rabi-1944 Nobel laureate in physics », Mayo Clinic Proceedings, vol. 87, no 2, février 2012.

<sup>12</sup> Shampo et Kyle, « Edward M. Purcell--Nobel Prize for magnetic resonance imaging », Mayo Clinic Proceedings, vol. 72, no 6, juin 1997.

<sup>13</sup> Hahn, « Spin Echoes », Physical Review, vol. 80, no 4, 15 novembre 1950.

<sup>14</sup> Proctor et Yu, « The Dependence of a Nuclear Magnetic Resonance Frequency upon Chemical Compound », Physical Review, vol. 77, no 5, 1 mars 1950

## 2. Notions base en RMN

### a. Définitions

- *Le spin*

Certains noyaux atomiques ( $^1\text{H}$ ,  $^2\text{H}$  (D),  $^{13}\text{C}$ ,  $^{14}\text{N}$ ,  $^{15}\text{N}$ , etc.) ont un moment magnétique particulier qui permet leur identification en RMN. Un noyau magnétique possède un moment cinétique intrinsèque connu sous le nom de **spin**, dont la magnitude est quantifiée par la constante de Planck réduite :

$$\hbar = \frac{h}{2\pi} \quad (\text{A2.1})$$

La magnitude du spin a pour expression :

$$|\vec{I}| = [I(I+1)]^{1/2} \hbar \quad (\text{A2.2})$$

avec  $I$  le nombre quantique de spin qui ne prend que des valeurs particulières  
 $I = 0, 1/2, 1, 3/2, 2, \dots$

La composante selon l'axe z du moment de spin angulaire est donnée par :

$$I_z = m \hbar \quad (\text{A2.3})$$

où  $m$  est le nombre quantique magnétique, qui peut prendre les valeurs quantifiées  
 $m = I, I-1, I-2, \dots -I$

L'exemple le plus simple est le proton, spin  $I = 1/2$ , qui lorsqu'il est placé dans un champ magnétique, a deux états possibles :  $m = I = 1/2$  ou  $m = I - 1 = -1/2$ .

Conventionnellement, ces deux états de spin sont appelés  $\alpha$  ( $m = 1/2$ ) et  $\beta$  ( $m = -1/2$ ). Ces deux états peuvent être visualisés en tant qu'orientations différentes du moment cinétique  $I_z$  :

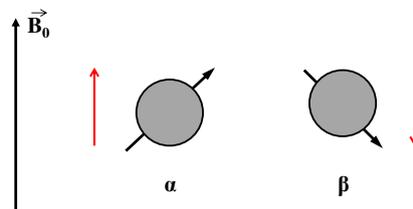


Figure 2 - Orientation du moment magnétique pour un spin  $1/2$  d'après Akoka<sup>15</sup>

<sup>15</sup> Akoka, « Principe de base », in Introduction à la résonance magnétique nucléaire

- *Moment magnétique nucléaire*

La RMN est un phénomène physique qui permet d'observer des noyaux soumis à un champ magnétique. Chaque noyau possède un **moment magnétique nucléaire**  $\vec{\mu}$  défini par :

$$\vec{\mu} = \gamma \vec{I} \quad (\text{A2.4})$$

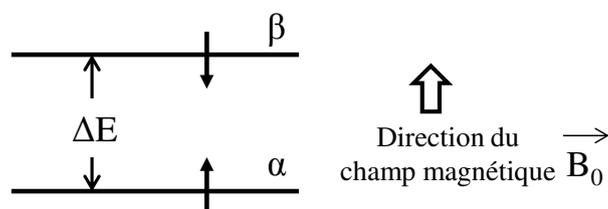
où  $\vec{I}$  est le moment cinétique nucléaire de spin, avec  $|\vec{I}| = \hbar I$ ,  $\gamma$  est le rapport gyromagnétique caractéristique de chaque noyau, et  $\hbar$  la constante de Planck réduite  $\hbar = \frac{h}{2\pi} = 1,05 \times 10^{-34}$  Js.

Chaque atome a sa propre valeur de moment magnétique et de constante gyromagnétique (Tableau 1).

Isotope	Moment Magnétique $\mu$ (N m T <sup>-1</sup> )	Constante gyromagnétique $\gamma$ (10 <sup>7</sup> rad s <sup>-1</sup> T <sup>-1</sup> )
<sup>1</sup> H	4,837	26,752
<sup>13</sup> C	1,216	6,728
<sup>15</sup> N	-0,490	-2,712

**Tableau 1 - Propriétés des spins<sup>16</sup>**

La projection du moment magnétique nucléaire sur un axe dy adopte une orientation suivant celle du moment cinétique  $I_z$  lorsqu'un noyau ( $\gamma > 0$ ) est placé dans un champ magnétique (Figure 3).



**Figure 3 – Exemple d'un noyau de spin 1/2, avec  $\gamma > 0$  qui possède deux orientations possibles du moment cinétique**

Le moment magnétique nucléaire peut avoir soit la même direction soit une direction opposée au champ magnétique extérieur. La différence d'énergie entre ces deux états,  $\Delta E$ , dépend de l'intensité du moment magnétique nucléaire et du champ magnétique appliqué,  $\vec{B}_0$ .  $\Delta E$  peut être mesurée en appliquant une irradiation électromagnétique de fréquence «  $\nu_0$  » appelée **fréquence de Larmor**. Cette irradiation (champ RF) engendre le passage d'un niveau à l'autre.  $\Delta E$  dépend de la constante de Planck :

$$\Delta E = h \nu_0 = \gamma \hbar |\vec{B}_0| \quad (\text{A2.5})$$

<sup>16</sup> Harris et al., « NMR Nomenclature. Nuclear Spin Properties and Conventions for Chemical Shifts (IUPAC Recommendations 2001). », no 73, 2001.

où  $\vec{B}_0$  est le champ magnétique uniforme et statique et  $\nu_0$ , la fréquence de Larmor définie par

$$\nu_0 = \frac{\gamma B_0}{2\pi} \quad (\text{A2.6})$$

$\gamma$  étant la constante gyromagnétique de chaque noyau.

Dans un ensemble de noyaux atomiques l'état de plus faible énergie est plus peuplé que l'état de plus haute énergie. La répartition des populations est décrite par l'équation de Boltzmann :

$$\frac{N_\beta}{N_\alpha} = e^{\frac{-\Delta E}{k_B T}} \quad (\text{A2.7})$$

où  $\Delta E$  est la différence d'énergie entre les niveaux d'énergie des deux états de spin,  $k_B$  la constante de Boltzmann ( $k_B = 1,38 \times 10^{-23}$  J/K), et  $T$  est la température en K.

La somme des moments magnétiques nucléaires d'un ensemble d'atomes est appelée **aimantation nucléaire  $\vec{M}$**  :

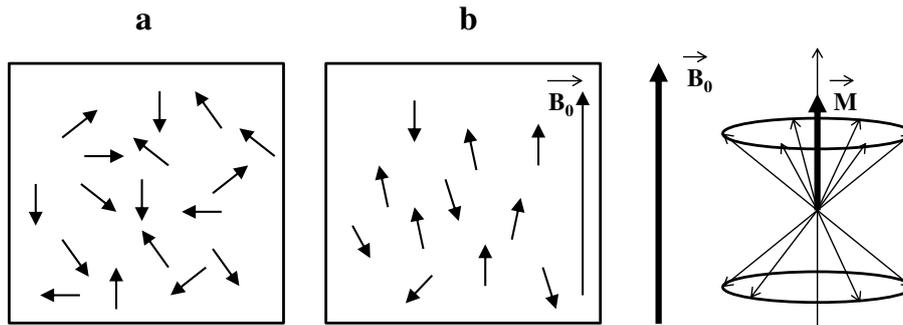


Figure 4 - Représentation de l'aimantation nucléaire  $\vec{M}$  :

(a) en absence de champ magnétique extérieur ( $|\vec{M}| = 0$ ) (b) en présence du champ magnétique extérieur :  $M$  est non nulle et est dirigée dans la même direction que le champ extérieur

L'aimantation  $\vec{M}$  n'est pas observable lorsqu'elle est parallèle à  $\vec{B}_0$  (Figure 4), il est nécessaire d'appliquer un champ magnétique local  $\vec{B}_1$  oscillant, dont l'orientation est perpendiculaire à  $\vec{B}_0$ .

$$\mathbf{B}_{1(t)} = 2|\mathbf{B}_1|\cos(2\pi\nu_0 t) \quad (\text{A2.8})$$

Pour l'observer, les moments magnétiques sont alors animés de mouvement de précession autour de ce champ local  $\vec{B}_1$ . L'aimantation devient alors observable lorsqu'elle est basculée dans le plan.

## b. Notions de base en RMN

- *Déplacement chimique*

Le déplacement chimique est la fréquence à laquelle on observe un signal sur le spectre RMN pour un noyau particulier. Le déplacement chimique dépend du champ effectif ressenti par le noyau.

Le champ magnétique perçu par le noyau est différent du champ extérieur appliqué :

$$\nu = \frac{\gamma B_{\text{local}}}{2\pi} = \frac{\gamma B_0}{2\pi} (1 - \sigma) \quad (\text{A2.9})$$

où  $B_{\text{local}}$  est le champ magnétique ressenti par le noyau et  $\sigma$  la constante de blindage.

La constante de blindage dépend de l'environnement électronique de chaque noyau. On définit alors un signal de référence. Le déplacement chimique est exprimé en ppm (*parties par million*), et défini par la relation :

$$\delta = \frac{\nu - \nu_{\text{ref}}}{\nu_{\text{ref}}} \times 10^6 \quad (\text{A2.10})$$

où  $\nu_{\text{ref}}$  est la fréquence de résonance de la référence et  $\nu$  la fréquence de résonance du noyau détecté.

La gamme usuelle des déplacements chimiques pour les noyaux les plus étudiés dans leurs environnements moléculaires sont,  $^1\text{H}$  : 0 - 15 ppm,  $^{13}\text{C}$  : 0 - 250 ppm,  $^{15}\text{N}$ , 0 - 450 ppm.

- *Couplage spin-spin*

Deux ou plusieurs moments magnétiques nucléaires peuvent interagir entre eux via un recouvrement électronique commun et ce phénomène se traduit par une division de leurs signaux en multiplets, dû au **couplage spin-spin**. Le signal de chaque noyau est divisé en  $2nI+1$  raies, où  $I$  est le nombre de spin ( $I = + 1/2$  pour les noyaux étudiés ici) et  $n$  le nombre d'atomes voisins. La distance séparant deux noyaux couplés est appelée **constante de couplage « J »**. On note généralement  $^nJ_{AX}$  la constante de couplage, où  $n$  est le nombre de liaisons chimiques qui séparent les spins couplés. Le couplage peut être homonucléaire ou bien hétéronucléaire (Figure 5).

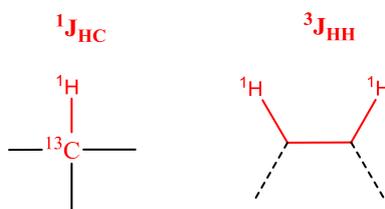


Figure 5 - Couplage hétéronucléaire (gauche)  $^1J_{\text{HC}}$  et homonucléaire (droite)  $^3J_{\text{HH}}$

Dans une molécule, on appelle noyaux équivalents deux atomes qui ont le même environnement chimique et magnétique. Ils seront représentés sur un spectre RMN par le même déplacement chimique. A contrario, des noyaux non équivalents auront des déplacements chimiques différents car ils n'ont pas le même environnement magnétique. C'est le cas, des protons diastéréotopiques qui sont portés par le même carbone et proches d'un centre asymétrique.

Quand un noyau A est couplé à deux autres noyaux non équivalents entre eux, leurs états de spin (-1/2 ; +1/2), donnent quatre possibilités, soit un *doublet de doublets* (Figure 6). Ce système, appelé AMX, correspond l'interaction avec deux noyaux non-équivalents, M et X et deux constantes de couplages distinctes  $J_{AX}$ ,  $J_{AM}$ .

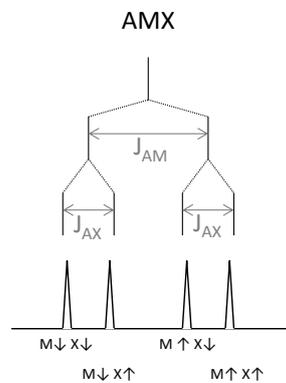


Figure 6 - Spectre d'un noyau A couplé à deux noyaux M et X, non équivalents.

Le système  $AX_2$  est un cas particulier du système AMX où les deux noyaux M et X sont équivalents, on a  $J_{AM} = J_{AX}$ . On obtient un spectre du noyau A où les deux raies centrales du doublet de doublets fusionnent. On n'observe plus que 3 raies équidistantes qui ont des intensités relatives 1 : 2 : 1. On peut alors observer un *triplet* (Figure 7).

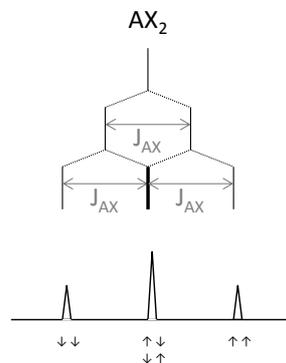


Figure 7 - Spectre de A couplé à deux noyaux équivalents  $X_2$

Si l'on augmente le nombre de noyaux en interaction (3 noyaux équivalents), le multiplet de A dans un système de spins  $AX_3$  est un *quadruplet* (Figure 8). Les deux raies centrales ont une intensité trois fois plus importante que les deux raies extérieures (Figure 8).

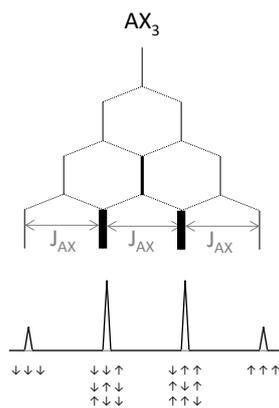


Figure 8 – Spectres de A couplé à trois noyaux équivalents X<sub>3</sub>

Dans le cas des spins 1/2, pour des couplages avec n spins X équivalents, le signal de A sera divisé en n + 1 raies dont les intensités relatives sont données par la (n+1)<sup>ème</sup> ligne du triangle de Pascal<sup>17</sup>.

Lorsque le couplage scalaire entre deux noyaux est fort par rapport à la différence entre leurs fréquences, le système est appelé AB, le nombre de raies de ce système et leurs intensités peuvent être modifiées :

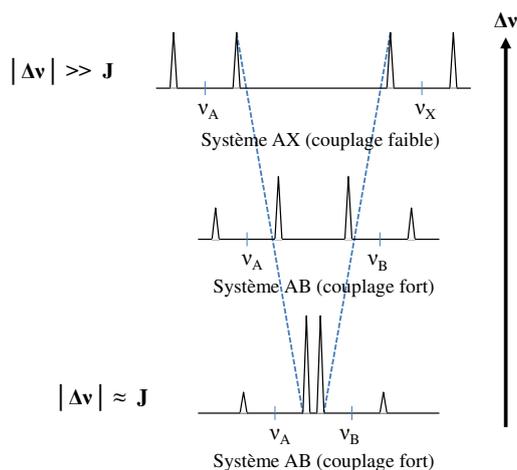


Figure 9 - Couplage fort : effet de toit<sup>18</sup>

Lorsque la différence entre les fréquences de résonance des deux noyaux couplés diminue (J reste fixe), les raies centrales augmentent en intensité, les raies extérieures diminuent. Cette déformation de l'intensité des multiplets porte le nom d'effet de toit.

- *Largeur de raies*

A l'équilibre, l'aimantation  $\vec{M}$  est alignée le long du champ  $\vec{B}_0$ . Lorsque  $\vec{M}$  est déplacée de son état d'équilibre,  $\vec{M}$  va progressivement retourner à son équilibre. Ce phénomène est appelé relaxation. On

<sup>17</sup> Edwards, « Pascal's Arithmetical Triangle », Goodreads,

<sup>18</sup> Clayden et al., Chimie organique, [s.l.] : De Boeck Supérieur, 10 décembre 2002, 1570 p.

distingue classiquement, deux types de relaxation. La **relaxation longitudinale**, qui est la relaxation correspondant au retour des populations à la distribution de Boltzmann caractérisant l'état d'équilibre, et la **relaxation transversale** qui décrit le retour à l'équilibre de l'aimantation selon le plan transverse (xy). La cinétique de ces deux types de relaxation peut être décrite par des récupérations exponentielles avec des constantes de temps caractéristiques  $T_1$  et  $T_2$  (voir la partie « *Relaxation RMN* »). La largeur de raies à mi-hauteur est proportionnelle à la constante de relaxation transversale  $T_2^*$  qui tient compte à la fois de la constante de relaxation transversale  $T_2$ , mais également de l'inhomogénéité du champ :

$$\Delta\nu = \frac{1}{\pi T_2^*} \quad (\text{A2.11})$$

## B. RMN 1D et 2D

### 1. Généralités RMN 1D

Afin d'obtenir un spectre RMN, il est nécessaire d'appliquer une impulsion de champ radiofréquence (RF). Cette impulsion a pour but d'exciter les spins nucléaires en basculant leur aimantation  $\vec{M}$  hors de l'axe z (orientation du champ magnétique  $B_0$ ). On parle alors d'impulsion  $90^\circ$  de phase x lorsque l'aimantation est redirigée dans le plan xy (Figure 10). Au cours de ce basculement la composante  $\vec{M}_y$  de l'aimantation  $\vec{M}$  varie ce qui génère un courant induit détecté par la bobine située sur l'axe Oy. Le signal induit par cette excitation est appelé signal de précession libre (FID).

La séquence d'impulsion se décompose en trois étapes :

#### Préparation ( $d_1$ ) – Excitation ( $p_1$ ) – Détection

Le FID est enregistré pendant la détection, il est nécessaire de réaliser une Transformée de Fourier (TF) pour obtenir un spectre de fréquences (Figure 10).

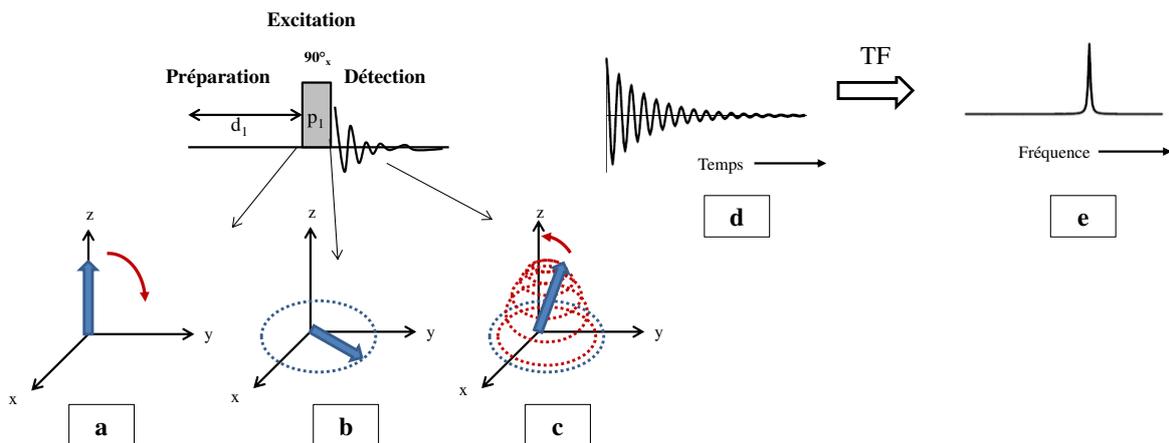


Figure 10 – Schéma d'une expérience 1D RMN  
Aimantation avant excitation (a) Aimantation après excitation (b) Aimantation en précession pendant la détection (c)  
FID obtenue (d) Spectre 1D (e)

### 2. Généralités RMN 2D

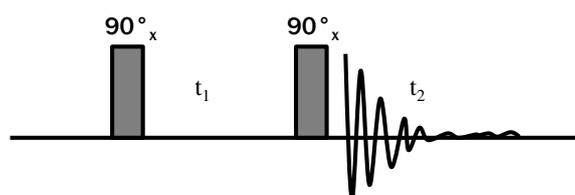
La RMN bidimensionnelle recueille des informations non pas dans un seul mais dans deux axes de fréquences. On peut ainsi obtenir davantage d'informations sur la molécule qu'avec spectre 1D.

La séquence d'impulsions d'une expérience à deux dimensions se décompose en quatre étapes : **Préparation – Evolution ( $t_1$ ) – Mélange (Mixing) – Détection ( $t_2$ )**

Le FID est enregistré pendant la période de détection. Dans la majorité des expériences 2D, la période d'évolution consiste à faire varier le délai  $t_1$  pendant lequel le déplacement chimique évolue. La période de mélange est basée sur deux mécanismes de transfert d'aimantation, tels que le couplage scalaire et l'interaction dipolaire.

La première expérience bidimensionnelle était une **COSY** (Correlation Spectroscopy) proposée par Jeener en 1971<sup>19</sup>. Celle-ci a été mise en place en 1976 par Aue et Ernst<sup>20</sup>. Cette expérience est la plus simple et la plus utilisée des expériences 2D, elle est basée sur le transfert de polarisation entre deux protons couplés.

La COSY est composée d'une préparation avec une impulsion  $90^\circ$  avec une phase  $x$ , puis d'une période d'évolution  $t_1$ , suivie d'une impulsion  $90^\circ$  avec une phase  $x$  pendant l'étape de mélange, et enfin l'acquisition pendant le temps  $t_2$  (Figure 11).



**Figure 11 - Séquence 2D typique (COSY)**

Comme pour une expérience 1D, une période d'évolution, dans ce cas  $t_1$ , module l'amplitude du signal, on réalise donc une succession d'expériences en faisant varier le temps d'évolution  $t_1$ .

Nous obtenons un spectre 2D avec dans chaque dimension, les déplacements chimiques des protons (Figure 12). La diagonale (pics en rouge) est une perspective du spectre 1D proton. Il existe des échanges de magnétisation entre les noyaux couplés, ceci aboutit à des pics d'intersections correspondant aux corrélations homonucléaires de couplage scalaire. Ces signaux sont situés hors diagonale (en bleu sur la Figure 12)

<sup>19</sup> Jeener, Lecture notes from Ampere Summer School in Basko Polje, Yugoslavia, 1971.

<sup>20</sup> Aue et al., « Two-dimensional spectroscopy. Application to nuclear magnetic resonance », The Journal of Chemical Physics, vol. 64, no 5, 1 mars 1976.

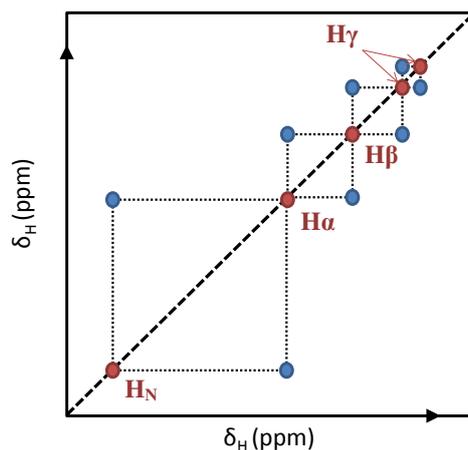


Figure 12 – Représentation schématique d'un spectre COSY

Au cours de ma thèse j'ai utilisé principalement deux types d'expériences en deux dimensions : l'**HSQC** (*Heteronuclear Single-Quantum Correlation Spectroscopy*) et la **TOCSY** (*Total Correlation Spectroscopy*), dont je vais détailler le principe.

### 3. L'expérience TOCSY

L'expérience TOCSY est similaire à la COSY. La différence entre les deux expériences est que pendant la TOCSY, l'aimantation est diffusée le long d'un système de couplages  $J$ , *e.g.*, la chaîne carbonée de l'acide aminé. On observe ainsi des signaux supplémentaires (Figure 13 en vert) correspondant aux autres protons connectés jusqu'à une distance de trois liaisons carbonées. Cette expérience est utile pour l'attribution des signaux dans le cas des protéines.

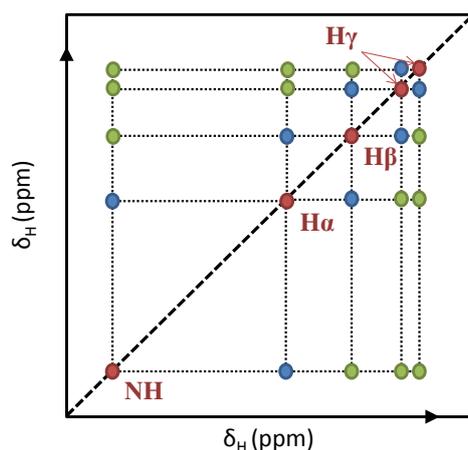


Figure 13 – Représentation schématique d'un spectre TOCSY

La séquence d'impulsions est très similaire à celle de la COSY. Elle commence par une préparation avec une impulsion  $90^\circ$ , une évolution  $t_1$ , puis une période appelée « spin lock » pendant laquelle un

champ RF avec une phase  $\phi = x$  est maintenu, le transfert de magnétisation entre protons a lieu, et enfin l'acquisition pendant le temps de détection  $t_2$ .

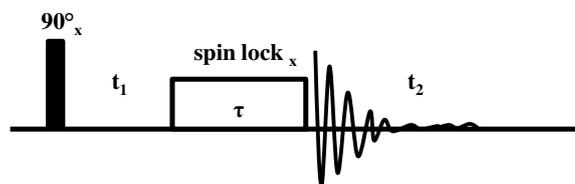


Figure 14 - Séquence d'impulsions d'une expérience TOCSY

#### 4. L'expérience INEPT et HSQC

L'expérience INEPT (*Insensitive Nuclei Enhanced by Polarization Transfer*) permet de transférer l'aimantation d'un noyau plus sensible, *i.e.*, ayant une constante gyromagnétique plus élevée ( $^1\text{H}$ ), à des noyaux moins sensibles, de plus faible constante gyromagnétique, tels que  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ . Ce bloc d'impulsions est retrouvé dans les expériences 2D hétéronucléaires.

L'INEPT repose sur le transfert de cohérence entre le proton et un hétéronoyau *via* le couplage scalaire. Ce transfert se fait pendant un temps  $\tau$  (Figure 15) dont la valeur doit être proche de la valeur de  $1/(4J_{IS})$ . Par exemple, pour une liaison  $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$ , dont la constante  $^1J_{\text{H-}^{13}\text{C}} = 150 \text{ Hz}$ , la valeur de  $\tau$  est de 1.67 ms. La présence de deux impulsions  $180^\circ$  pendant la période  $2\tau$  permet de transférer l'aimantation d'un noyau à l'autre, tout en empêchant l'évolution sous l'effet du déplacement chimique. L'aimantation est transférée à l'hétéroatome à l'aide des deux dernières impulsions  $90^\circ$  sur les deux noyaux.

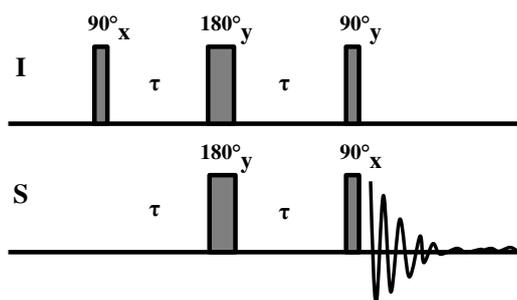


Figure 15 - Séquence d'impulsions d'une expérience

Dans l'expérience HSQC, la séquence corrèle un hétéroatome ( $^{13}\text{C} / ^{15}\text{N}$ ) au proton couplé. Chaque signal obtenu sur un spectre 2D  $^1\text{H} - ^{15}\text{N}$ -HSQC correspond à la corrélation entre un proton et l'azote auquel il est lié (Figure 16). Dans un spectre HSQC, il n'y a pas de diagonale comme dans les spectres homonucléaires (TOCSY), dû au fait que les noyaux observés pendant la durée  $t_1$  et  $t_2$  sont différents.

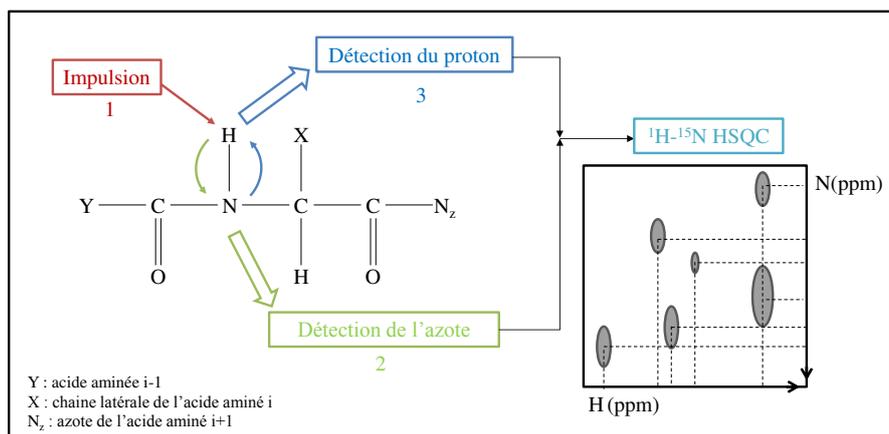


Figure 16 - Principe de l'expérience  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC

Pendant l'expérience HSQC, l'aimantation est transférée du proton à l'hétéroatome adjacent en utilisant la séquence d'impulsions INEPT (Figure 15). Ce module INEPT est suivi d'une période d'évolution  $t_1$  pendant laquelle le déplacement chimique de l'hétéronoyau est enregistré. Enfin, le dernier module est une INEPT inversée (« reverse-INEPT »), au cours de laquelle l'aimantation est retransférée au proton avant la détection.

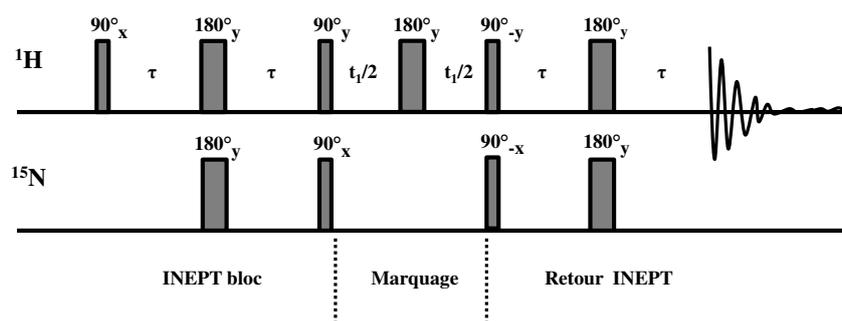


Figure 17 - Séquence d'impulsion d'une expérience HSQC

## C. Relaxation RMN

### 1. Généralités

Le champ ressenti par un noyau varie avec la rotation des molécules en solution. Le temps caractéristique pour la rotation moléculaire brownienne est appelé **temps de corrélation rotationnelle**,  $\tau_c$ . Pour une molécule sphérique de rayon  $\Gamma$ , introduite dans un milieu de viscosité  $\eta$ , le temps de corrélation rotationnelle peut être calculé par la relation :

$$\tau_c = \frac{4\pi\Gamma^3\eta}{3k_B T} = \frac{V\eta}{k_B T} \quad (\text{B1.1})$$

où  $V$  est le volume de la molécule,  $k_B$  est la constante de Boltzmann et  $T$  la température<sup>21</sup>.

Le mouvement rotationnel dépend donc de la taille de la molécule. En effet, il est plus lent pour une grosse molécule (protéine) et plus rapide pour une petite molécule isolée *e.g.*, acide aminé seul. Ce mouvement rotationnel est également influencé par la viscosité du milieu : plus le milieu est visqueux plus le mouvement est lent.

Les différents types de relaxation dépendent du temps de corrélation rotationnel. Lorsque  $\tau_c$  est rapide (petite molécule ou faible viscosité) les temps  $T_1$  et  $T_2$  sont élevés, ce qui correspond à une relaxation lente. Pour des temps  $\tau_c$  faibles ( $10^{-6}$  s) le temps de relaxation transversale est faible contrairement au temps de relaxation longitudinale, qui est élevée (Figure 18).

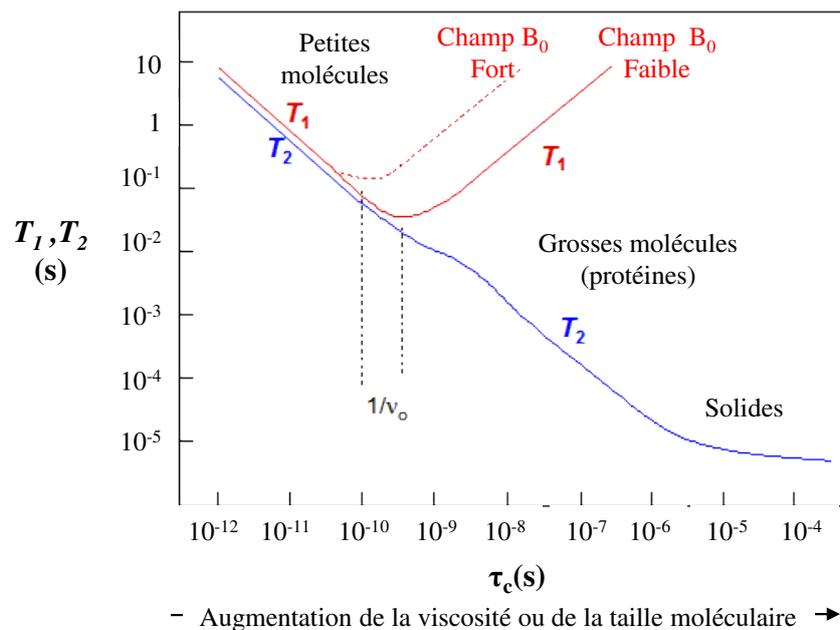


Figure 18 - Temps de relaxation  $T_1$  et  $T_2$  en fonction du temps de corrélation rotationnel.<sup>22</sup>

<sup>21</sup> Lavalette et al., « Microscopic Viscosity and Rotational Diffusion of Proteins in a Macromolecular Environment », Biophysical Journal, vol. 76, no 5, mai 1999

L'étude des temps de relaxation est une méthode pour étudier la dynamique des molécules par RMN.

## 2. La relaxation longitudinale : $T_1$

Le temps longitudinale, ou spin-réseau,  $T_1$  caractérise le retour à l'équilibre de l'aimantation longitudinale de relaxation. Ce retour à l'équilibre correspond au retour à la distribution de Boltzmann des populations des états de spin  $\alpha$  et  $\beta$ . La récupération suit une loi monoexponentielle dont l'équation est :

$$(\mathbf{M}_z - \mathbf{M}_{eq})(t) = (\mathbf{M}_z - \mathbf{M}_{eq})_0 (e^{-\frac{t}{T_1}}) \quad (\text{B2.1})$$

Une faible valeur de  $T_1$  signifie que le retour de l'aimantation longitudinale est plus rapide.

Une des séquences d'impulsions permettant de mesurer le  $T_1$  est la séquence dite **d'inversion-récupération** (Figure 19) :

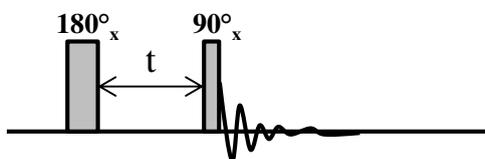
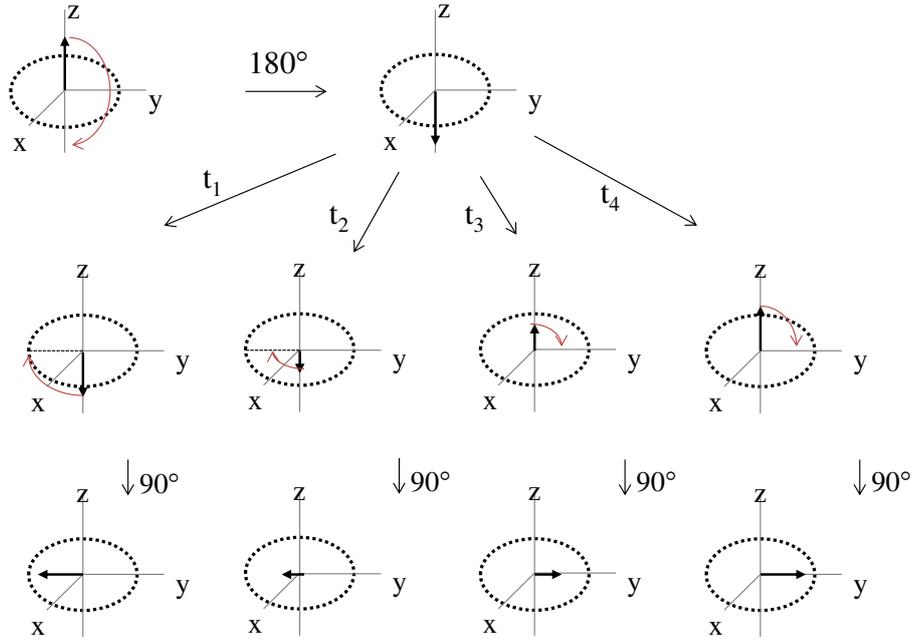


Figure 19 - Séquence d'inversion-récupération pour mesurer la relaxation longitudinale

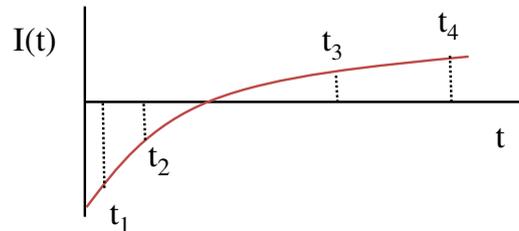
Il faut tout d'abord réaliser une impulsion de  $180^\circ$ , l'aimantation est inversée, puis on laisse un temps  $t$  qui sera variable au cours des expériences successives. Pendant ce temps  $t$ , l'aimantation va retourner à l'équilibre le long de l'axe  $z$ . Enfin on applique une impulsion de  $90^\circ$  afin que l'aimantation soit dans le plan  $xy$  ( $90^\circ$  par rapport à l'axe  $z$ ) et donc observable en RMN (Figure 20).

<sup>22</sup> Bloembergen et Purcell, « Relaxation Effects in Nuclear Magnetic Resonance Absorption », vol. 73, 1948.



**Figure 20 - Représentation vectorielle de l'évolution de l'aimantation  $\vec{M}$  au cours de l'inversion-récupération d'après Hore<sup>6</sup> avec  $t = t_1, t_2, t_3$  et  $t_4$**

Afin de pouvoir déterminer le temps de relaxation  $T_1$  on réalise une série d'expériences en faisant varier le temps « t » (Figure 19). La courbe des intensités en fonction du temps t, ainsi obtenue (Figure 21) suit une loi exponentielle (2.1).



**Figure 21 - Exemple de courbe attendue en utilisant une séquence d'inversion-récupération d'après Hore<sup>6</sup>**

La valeur de  $T_1$  est obtenue en ajustant les intensités mesurées à la loi monoexponentielle donnée par l'équation B2.1. Une approximation de la valeur de  $T_1$  peut être trouvée par la valeur du point zéro de la courbe  $I_{(t_{nul})} = 0$ . Dans ce cas,  $t_{nul} = T_1 \ln(2)$ .

En RMN du liquide, le temps de relaxation longitudinale des protons est généralement de l'ordre de quelques secondes.

### 3. La relaxation transversale : $T_2$

Le temps de relaxation transversale  $T_2$ , correspond à la perte de cohérence de phase, c'est-à-dire la perte de l'aimantation dans le plan (xy) perpendiculaire à  $B_0$ . Le retour à l'équilibre de la composante transversale de l'aimantation suit également une loi monoexponentielle :

$$M_{xy(t)} = M_{xy(0)} e^{-\frac{2t}{T_2}} \quad (\text{B3.1})$$

La relaxation  $T_2$  est produite par une fluctuation du champ magnétique dans toutes les directions.

Une des séquences d'impulsions pour mesurer le  $T_2$  est la suivante (Figure 22) :

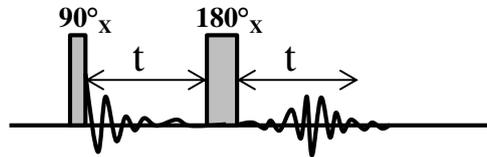


Figure 22 - Séquence d'impulsions écho de spins pour mesurer la relaxation transversale<sup>6</sup>

Cette séquence consiste à appliquer une impulsion de  $90^\circ$ . L'aimantation est ainsi basculée dans le plan (xy) où elle va précesser pendant une durée  $2t$  qui sera variable selon les expériences successives. On réalise une impulsion de  $180^\circ$  par rapport à l'axe x et l'aimantation est alors partiellement rephasée. Le signal produit est appelé écho de spins. (Figure 23). Cette séquence a été proposée par Carr et Purcell et modifiée par Meiboom et Gill<sup>23</sup>.

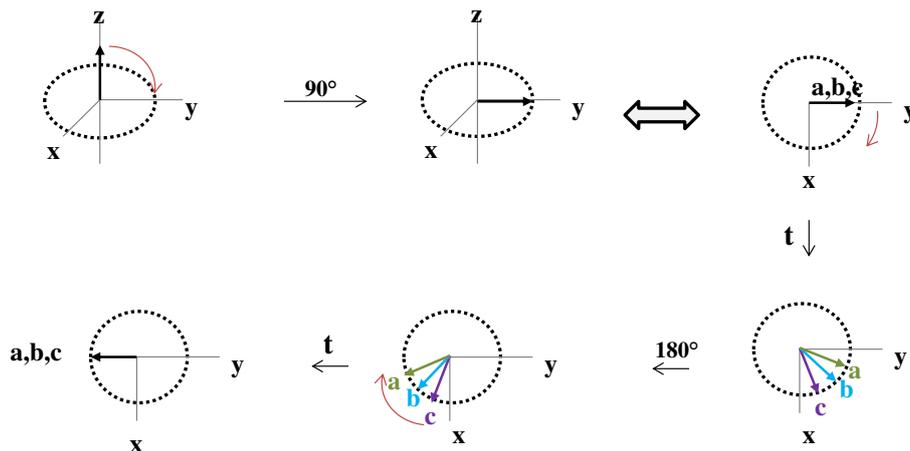


Figure 23 - Evolution de l'aimantation  $\vec{M}$  au cours de la séquence écho de spins d'après Hore<sup>6</sup>

<sup>23</sup> Meiboom et Gill, « Modified Spin-Echo Method for Measuring Nuclear Relaxation Times », Review of Scientific Instruments, vol. 29, no 8, 1 août 1958.

La relaxation transversale est sensible aux interactions spin-spin. La courbe obtenue lors de l'étude de la relaxation transversale est une courbe décroissante (Figure 24).

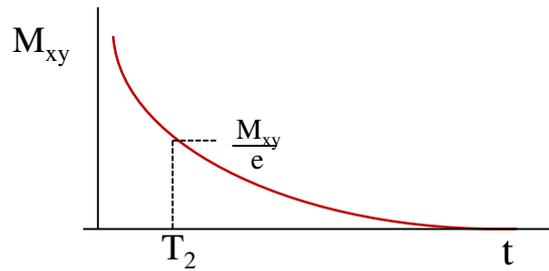


Figure 24 - Courbe obtenue lors de la mesure des intensités au cours de l'expérience écho de spins d'après Boyle<sup>24</sup>

La valeur de la constante de temps  $T_2$  est obtenue en ajustant les intensités mesurées à la loi monoexponentielle donnée par l'équation B3.1. Le  $T_2$  correspond au temps mis par l'aimantation transversale pour revenir à 37 % (=  $M_{xy} / \exp$ ) de sa valeur initiale. La relaxation transversale est beaucoup plus rapide que la relaxation longitudinale :  $T_2$  est toujours plus court ou égal à  $T_1$ .

---

<sup>24</sup> Boyle and Wesson, 'Pulsed Nuclear Magnetic Resonance', in Methods of Experimental Physics, 2004.

## D. Mécanismes d'interaction et relaxation

La relaxation nucléaire découle de plusieurs mécanismes. Dans le cas des protons, la principale contribution à la relaxation provient des interactions dipôle-dipôle avec les noyaux voisins.

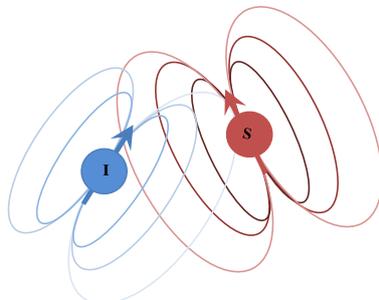


Figure 25 – Interaction dipolaire d'après Salmon et coll<sup>25</sup>

Le moment magnétique du noyau S (rouge) génère un champ magnétique, représenté par ses lignes de champs, ressenti par le noyau I (bleu) et inversement.

Le champ magnétique d'un noyau fluctue lorsque la molécule est animée d'un mouvement de rotation et constitue une source de relaxation pour les noyaux voisins. Ainsi un spin I est soumis au champ magnétique généré par tous les noyaux voisins dans l'espace. Cet effet correspond à ce que l'on nomme communément **interaction dipôle-dipôle** (DD). Les interactions DD sont très fortes pour les  $^1\text{H}$ , de l'ordre de quelques kilohertz et dépendent principalement de la distance entre deux noyaux. Dans le cas du proton, l'interaction DD constitue souvent la source majeure de relaxation.

Après ces généralités sur la RMN nous allons nous intéresser aux outils spectroscopiques développés au cours de cette thèse en commençant par les états et cohérences de spins à longs temps de vie.

<sup>25</sup> Salmon et Blackledge, « La RMN biomoléculaire ou la révolution en mouvement », édition L'actualité chimique, sect. N° 364-365, aout 2012.

## E. Les états et cohérences de spins à longs temps de vie

Les états de spins à longs temps de vie sont des différences de population sur les états propres des deux noyaux magnétiquement non équivalents, l'état singulet et les états triplets. Avant de détailler les différentes utilisations des Long-Lived States (LLS) et Long-Lived Cohérences (LLC), il est nécessaire d'expliquer ce que sont les états singulet et triplets.

Les états singulet et triplets sont des états propres d'un système de deux spins 1/2 couplés. Les deux protons diastéréotopiques de la glycine (Figure 26) en sont un exemple.

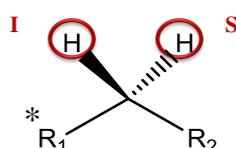


Figure 26- Système de deux spins 1/2 couplés avec un couplage  $^2J_{HH}$

Les protons diastéréotopiques sont non équivalents tant que  $R_1$  et  $R_2$  sont différents, car ils ne voient pas le même environnement. Pour preuve, le déplacement chimique de ces deux protons est différent sur un spectre RMN. Il existe différentes manières de rendre équivalents deux spins 1/2 couplés. La première est de retirer l'échantillon du champ magnétique<sup>26</sup>, la deuxième est de rendre la molécule symétrique ( $R_1 = R_2$ ) par réaction chimique<sup>27</sup>, et la troisième est d'appliquer un fort champ radio-fréquence (RF) sur le système de spin<sup>4</sup>. L'application du champ RF détermine la transition entre une situation avec des spins non équivalents à des spins équivalents (Figure 27).

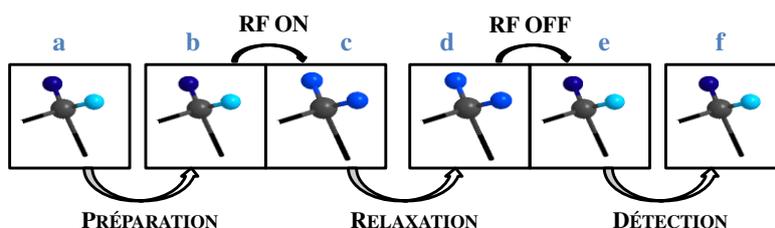


Figure 27 - Etat de spin à longs temps de vie –transition entre des spins non équivalents (a, b) et spins équivalents (c, d) et à nouveau vers l'état non équivalents (e, f)

### 1. Long-Lived States (LLS)

Les états de spin nucléaires à longs temps de vie ont été mis en évidence pour la première fois par Carravetta et Levitt<sup>4, 26</sup>. Ils ont montré qu'il était possible d'exciter et d'observer l'évolution de la

<sup>26</sup> Carravetta et al., « Beyond the T1 Limit: Singlet Nuclear Spin States in Low Magnetic Fields », Physical Review Letters, vol. 92, no 15, 14 avril 2004.

<sup>27</sup> Warren et al., « Increasing hyperpolarized spin lifetimes through true singlet eigenstates », Science (New York, N.Y.), vol. 323, no 5922, 27 mars 2009.

population des états singulet et triplets dans un système possédant une paire de spins couplés. Ces états de spins à longs temps de vie ont différentes utilisations, notamment pour l'étude du phénomène de diffusion<sup>28</sup> ou encore pour celle des échanges chimiques<sup>29</sup>.

Les LLS correspondent à une différence de population entre l'état singulet et les états triplets (Figure 28).

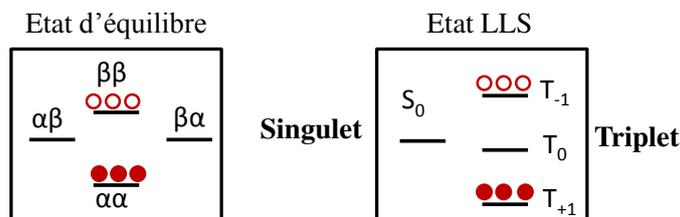


Figure 28 - Etat LLS (droite) et état d'équilibre (gauche)

$$S_0 = \frac{1}{\sqrt{2}} (|\alpha_I \beta_S\rangle - |\beta_I \alpha_S\rangle) ; T_{+1} = |\alpha_I \alpha_S\rangle ; T_0 = \frac{1}{\sqrt{2}} (|\alpha_I \beta_S\rangle + |\beta_I \alpha_S\rangle) ; T_{-1} = |\beta_I \beta_S\rangle$$

L'expérience commence toujours par une différence de population entre les états triplets, et on retrouve cette différence après la fin de la relaxation. La différence de population entre l'état singulet et les états triplets diminue pendant le temps de relaxation LLS (Figure 29).

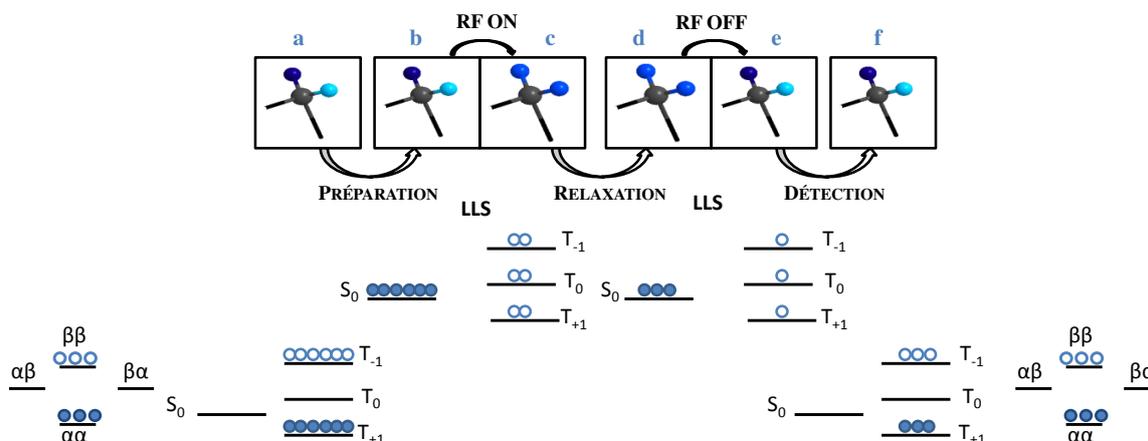


Figure 29 - Mécanisme de la transition entre états lors d'une expérience LLS

La séquence utilisée pour les LLS commence par une impulsion  $90^\circ$  avec une phase x, suivi d'une séquence symétrique autour du temps de soutien RF de l'état singulet de durée «  $\tau_m$  » composée d'une impulsion  $180^\circ$  avec une phase x puis d'une impulsion  $45^\circ$  avec une phase y (Figure 30). Cette séquence est optimisée pour diriger l'aimantation vers un déséquilibre entre l'état singulet  $S_0$  et les états triplets durant  $\tau_m$ .

<sup>28</sup> Ahuja et al., « Diffusion Coefficients of Biomolecules Using Long-Lived Spin States », Journal of the American Chemical Society, vol. 131, no 22, 10 juin 2009

<sup>29</sup> Sarkar et al., « Singlet-state exchange NMR spectroscopy for the study of very slow dynamic processes », Journal of the American Chemical Society, vol. 129, no 2, 17 janvier 2007.

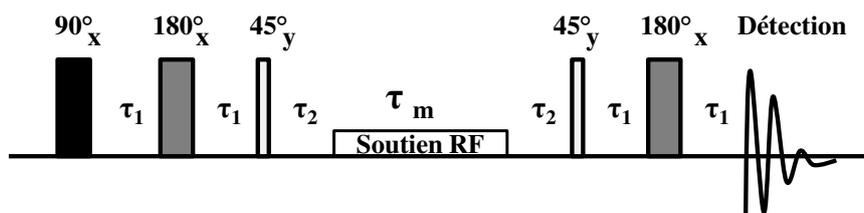


Figure 30 - Séquence d'impulsions des LLS

Comme pour les autres types de relaxation, la population LLS décroît selon une loi exponentielle :

$$I = I_0 \times e^{(-\tau_m/T_{LLS})} \quad (D1.1)$$

avec  $I$  correspondant à l'intensité,  $I_0$  pour  $\tau_m = 0$ ,  $\tau_m$  délai du soutien RF, et  $T_{LLS}$  temps de relaxation LLS.

Les LLS sont insensibles aux interactions dipôle-dipôle entre les noyaux concernés. Les LLS sont caractérisés par le temps  $T_{LLS}$ , qui est souvent plus élevée que la constante de temps longitudinale  $T_1$ , dans des systèmes où des noyaux I et S impliqués dans un état LLS sont isolés par rapport à des noyaux magnétiques extérieurs. Si l'on compare les courbes de relaxation de  $T_1$  et  $T_{LLS}$  on s'aperçoit que la décroissance selon le  $T_1$  peut être beaucoup plus rapide que celle selon les LLS (Figure 31).

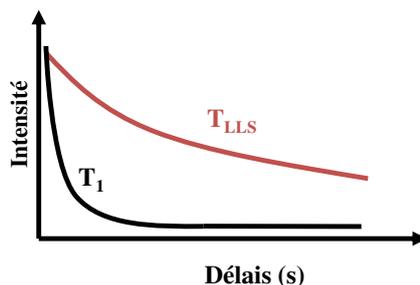


Figure 31 - Comparaison des courbes de relaxation de l'aimantation longitudinale et des états à longs temps de vie, caractérisées par les temps de relaxation  $T_1$  et  $T_{LLS}$  respectivement

Lors d'une étude de relaxation d'une molécule de sucre partiellement deutérée, le temps de relaxation  $T_{LLS}$  était 40 fois plus élevée que le  $T_1$  mesuré. Le même constat a été fait lors de l'étude de la relaxation des protons  $H^\alpha$  du dipeptide L-Ala-Gly<sup>28</sup>. La plus grande valeur de  $T_{LLS}$  observée est de 30 min environ, mesurée sur une molécule marquée à l'azote  $^{15}N_2O$ <sup>30</sup>.

Les états LLS sont utilisées en combinaison avec la Polarisation Dynamique Nucléaire (DNP), voir la partie « Polarisation Dynamique Nucléaire ».

<sup>30</sup> Pileio et al., « The long-lived nuclear singlet state of  $^{15}N$ -nitrous oxide in solution », Journal of the American Chemical Society, vol. 130, no 38, 24 septembre 2008.

Les LLS ont montré leur utilité dans diverses études telles que l'étude de dynamique des protéines<sup>31</sup> ou le suivi d'interactions intermoléculaires<sup>32</sup>.

Bornet et al<sup>31</sup> ont montré qu'il était possible de suivre grâce aux LLS, la dénaturation de l'ubiquitine par l'urée. Les temps de relaxation des LLS et de l'aimantation longitudinale ont été mesurés pour la sérine 65 située au cœur de la protéine :  $T_{LLS} < 1$  s,  $T_I = 1$  s pour la protéine native et  $T_{LLS} = 12$  s,  $T_I = 1$  s pour la protéine dénaturée. Nous avons ainsi montré que le temps de relaxation longitudinale  $T_I$  de la sérine 65 était insensible à la nature repliée ou dépliée de la protéine.

Salvi et al<sup>32</sup> ont comparé le suivi d'interactions entre une protéine et son substrat par la méthode LLS et la méthode de relaxation longitudinale. Encore une fois, la relaxation longitudinale est moins sensible aux interactions que les LLS.

La publication de Calvadini et coll.<sup>9</sup> en annexe présente une étude plus précise de la méthode LLS.

## 2. Long-Lived Coherences (LLC)

Les LLS maintiennent l'aimantation, mais cette méthode ne permet pas de diminuer les largeurs de raies. Récemment, il a été démontré qu'à champ faible, il est possible d'avoir une transition entre l'état singulet et l'état triplet<sup>33</sup>. A haut champ, il a été montré qu'une cohérence était possible entre les états singulet et triplets<sup>34</sup> (Figure 32).

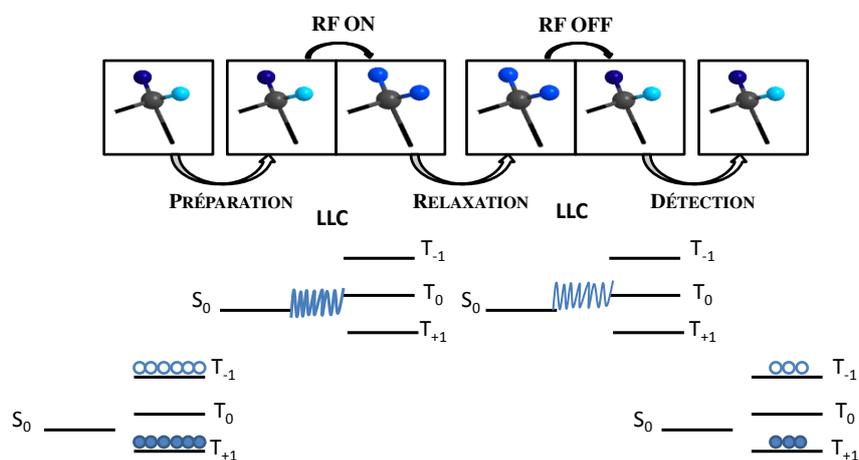


Figure 32 - Mécanisme de la transition pour l'excitation des LLC

<sup>31</sup> Bornet et al., « Long-lived states to monitor protein unfolding by proton NMR », Chemphyschem: a European journal of chemical physics and physical chemistry, vol. 12, no 15, 24 octobre 2011.

<sup>32</sup> Salvi et al., « Boosting the sensitivity of ligand-protein screening by NMR of long-lived states », Journal of the American Chemical Society, vol. 134, no 27, 11 juillet 2012.

<sup>33</sup> Pileio et al., « Extremely low-frequency spectroscopy in low-field nuclear magnetic resonance », Physical Review Letters, vol. 103, no 8, 21 août 2009.

<sup>34</sup> Sarkar et al., « Long-lived coherences for line-narrowing in high-field NMR », Progress in nuclear magnetic resonance spectroscopy, vol. 59, no 1, juillet 2011.

$$Q_{LLC} = (|S_0\rangle \langle T_0| + |T_0\rangle \langle S_0|) \frac{1}{\sqrt{2}}$$

Les LLC sont insensibles aux inhomogénéités du champ  $B_0$ , et ceci permet d'avoir une meilleure sensibilité et d'augmenter la résolution, c'est-à-dire que les signaux sont plus fins<sup>5</sup> (Figure 33).

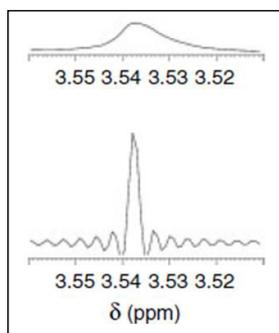


Figure 33 - Largeur de raies du signal de la glycine 76 de l'Ubiquitine sans LLC (haut) et avec LLC (bas)

La séquence LLC est composée d'une excitation sélective du noyau S suivie d'une impulsion  $90^\circ$  avec une phase x sur les deux noyaux et d'un temps d'évolution  $\tau_1$  (champ RF oscillatoire pendant cette durée) avant la détection. L'impulsion sélective, comme son nom l'indique, va affecter uniquement le spin d'intérêt.

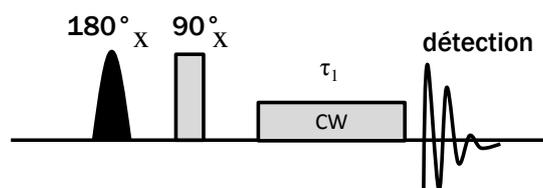


Figure 34 - Séquence d'impulsions LLC

Le système étudié par la méthode LLC (système de deux spins I et S couplés par une constante à deux liaisons  ${}^2J_{IS}$ ) donne deux doublets sur un spectre RMN (Figure 35). Ces doublets sont caractérisés par une constante de couplage «  ${}^2J_{IS}$  » séparés par une distance «  $\Delta\nu$  », et le centre des deux doublets est à la fréquence «  $\nu_{RF}$  » (Figure 35 gauche).

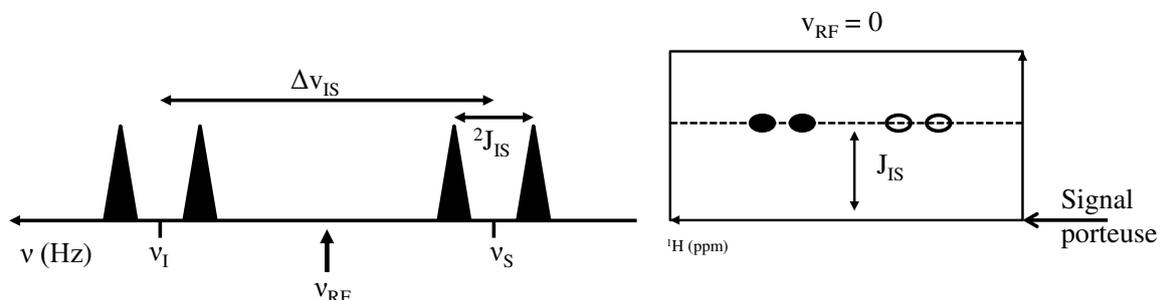


Figure 35 - Spectre  ${}^1H$  du système de deux spins I et S couplés (gauche) spectre 2D obtenu (droite)

Contrairement aux LLS, les LLC possèdent une évolution oscillatoire et non uniquement exponentielle. Les LLC sont donc susceptibles d'engendrer un spectre à deux dimensions suite à une transformée de Fourier (Figure 35 droite).

Selon la position de l'application du champ RF, on devrait arriver à séparer les différents systèmes de spins couplés présents dans la biomolécule, selon l'axe des ordonnées (dimension indirecte).

A  $\nu_{RF} = 0$ , les signaux des doublets sont espacés d'une valeur égale à la constante de couplage  $J$  (Figure 35 droite). Lorsqu'on applique ce champ à droite ou à gauche du centre des doublets (Figure 36 gauche), les signaux sur le spectre 2D sont distants d'une valeur supérieure à la constante de couplage  $\nu'_{LLC} > J$  (Figure 36 droite).

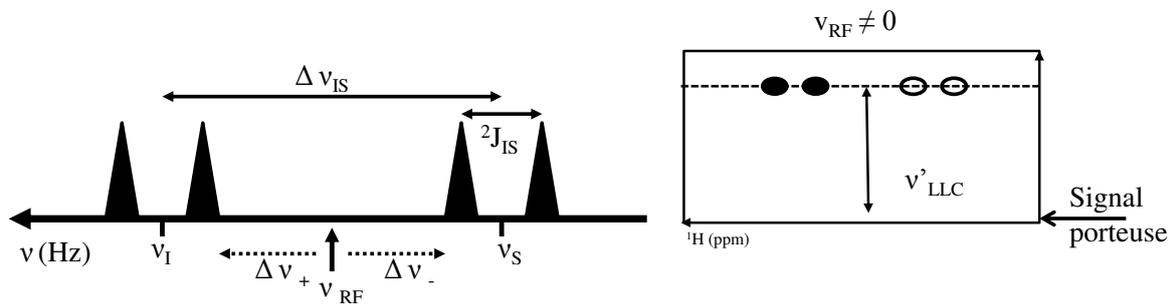


Figure 36 – Spectre 2D LLC lorsque  $\nu_{RF} \neq 0$

On améliore ainsi la résolution des spectres en séparant des signaux (non séparables sur un spectre 1D) dans une seconde dimension.

## F. Polarisation dynamique nucléaire (*dynamic nuclear polarization-DNP*)

### 1. Généralités

La RMN a de nombreuses applications, cependant elle est souvent limitée en termes de sensibilité, ce qui restreint son application dans l'étude de molécules dans un milieu biologique à des concentrations physiologiques. Les techniques d'hyperpolarisation, comme la Polarisation Dynamique Nucléaire (DNP) sont un atout majeur dans ce contexte. La DNP par dissolution est capable d'augmenter la sensibilité par un facteur  $\epsilon = \frac{S_{DNP} - S_{RMN}}{S_{RMN}} = 10^4$ .<sup>35</sup>

La polarisation est définie par :

$$P = \frac{n_{\alpha} - n_{\beta}}{n_{\beta} + n_{\alpha}} = \tanh\left(\frac{\gamma h B_0}{4\pi kT}\right) \quad (F1.1)$$

En absence de polarisation,  $P = 0$ , la distribution de la population est égale entre les deux niveaux d'énergie ( $\alpha$  et  $\beta$ ). Lorsque  $P = 1$ , les spins sont tous sur le niveau inférieur et  $P < 0$ , les spins occupent principalement le niveau le plus élevé. Lors de l'équilibre thermique  $P$  est toujours positive. D'après l'équation (F1.1), on s'aperçoit que la polarisation est plus élevée à basse température. En effet, à 1 K, la polarisation des protons approche les  $P = 2.4 \%$  pour  $B_0 = 23 \text{ T}$ .<sup>3</sup>

La DNP augmente la polarisation des spins nucléaires à l'état solide. Des électrons non appariés étant nécessaires pour la polarisation, des radicaux libres sont ajoutés lors de la préparation de l'échantillon. Pour que la polarisation soit efficace, les radicaux sont mélangés de façon homogène. Les spins des électrons puisqu'ils sont polarisés, transfèrent la polarisation aux spins nucléaires *via* une excitation par une irradiation micro-ondes (Figure 37) dont la fréquence utilisée est  $\nu_0$  et. Cette irradiation permet l'interaction entre les électrons et les noyaux, *via* transitions de spin simultanées des deux espèces.

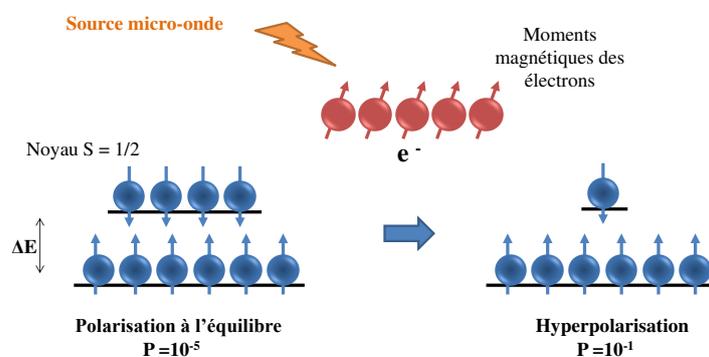


Figure 37 - Effet de la DNP sur les spins

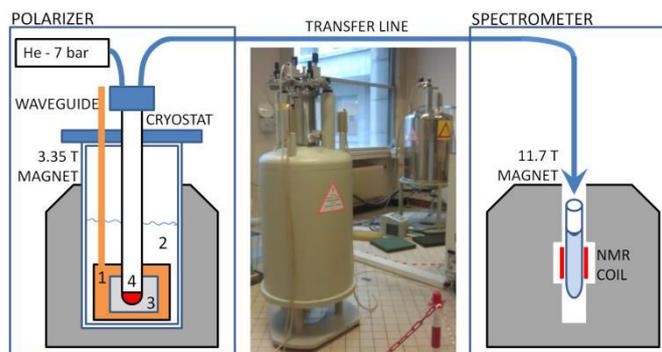
<sup>35</sup> Ardenkjær-Larsen et al., « Increase in signal-to-noise ratio of > 10,000 times in liquid-state NMR », Proceedings of the National Academy of Sciences, vol. 100, no 18, 9 février 2003

Afin d'obtenir une polarisation efficace, il est nécessaire d'avoir un rapport optimal entre la densité des spins nucléaires et celle des électrons. Si la densité des électrons est trop faible, la polarisation n'est pas suffisante.

Depuis les années 2000, l'utilisation de la DNP a progressé, notamment dans le domaine clinique afin de suivre l'effet du traitement sur certains types de cancer, *e.g.*, prostate<sup>36</sup>. Cette technique permet de suivre les transformations métaboliques en temps réel. Cependant, une des principales limitations réside dans la durée de vie de l'aimantation nucléaire. Pour pallier à ce problème, l'utilisation de la technique des LLS (technique présentée au paragraphe « *Etats de spin à longs temps de vie* ») pourrait s'avérer utile<sup>4, 29</sup>.

## 2. Principe

L'appareillage DNP est composé d'un polariseur relié à un spectromètre. L'échantillon est placé dans un support en téflon situé à l'extrémité d'une canne que l'on introduit dans le polariseur *via* l'insert situé au centre de l'aimant. Cet insert est un tube en métal qui permet de guider l'échantillon jusqu'au cryostat. L'insert est lui-même placé dans le dewar à hélium qui est relié à sa pompe (Figure 38). Pendant la polarisation l'échantillon est placé à une température  $T = 1$  K, le champ magnétique est  $B_0 = 3.35$  T. La source micro-ondes polarise les électrons de l'échantillon<sup>37</sup> : l'énergie est ensuite transférée aux spins nucléaires permettant d'hyperpolariser l'aimantation du composé étudié. Après la dissolution, l'analyse RMN est réalisée sur un spectromètre à haut champ. Le temps de transfert entre le site de polarisation et le tube RMN qui se trouve dans le spectromètre à haut champ doit être très court afin que l'aimantation n'ait pas le temps de relaxer complètement.



**Figure 38 - Schéma descriptif de la technique DNP**  
**(1) Polariseur de la source micro-ondes (2) pompe à hélium (3) cryostat (4) échantillon**

<sup>36</sup> Nelson et al., « Metabolic imaging of patients with prostate cancer using hyperpolarized [1-13C]pyruvate », Science Translational Medicine, vol. 5, no 198, 14 août 2013.

<sup>37</sup> Jannin et al., « A 140 GHz prepolarizer for dissolution dynamic nuclear polarization », The Journal of Chemical Physics, vol. 128, no 24, 28 juin 2008.

Dans une étude précédente portant sur l'utilisation de la DNP sur un échantillon d'urée non marquée en carbone 13, un spectre 1D carbone a pu être obtenu avec un gain pour le rapport signal / bruit supérieur à 600.<sup>38</sup>

### 3. Agents polarisants

Le mécanisme qui régit l'expérience DNP dépend fortement du choix de l'agent polarisant. Cet agent polarisant peut être soit exogène (biradical ajouté au milieu) soit endogène (radical présent dans la protéine). Dans la DNP liquide, il est possible de dissoudre l'agent polarisant dans le solvant. Cinq molécules sont fréquemment utilisées comme agent polarisant (Figure 39) :

- **BDPA** (*trityl et bis- $\alpha,\gamma$ -diphenylene- $\beta$ -phenyl-llyl*)<sup>39</sup>,
- **TEMPOL** (*4-hydroxy-2,2,6,6-tetramethylpiperidin-1-oxyl*)<sup>40</sup>,
- **Trityl**<sup>41</sup>.

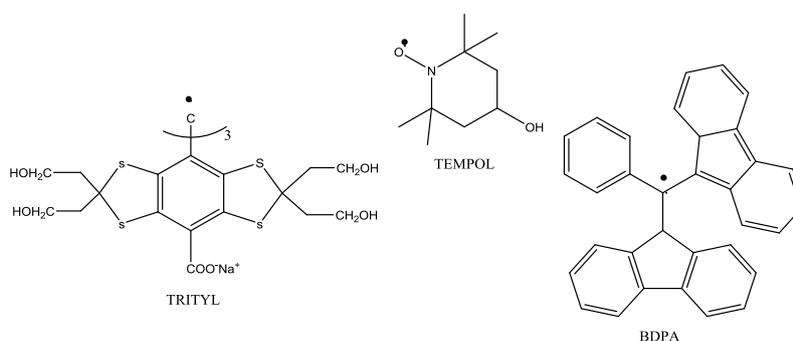


Figure 39 - Agents polarisants<sup>38</sup>

Au cours des expériences réalisées durant cette thèse, l'agent polarisant utilisé est le TEMPOL.

<sup>38</sup> Maly et al., « Dynamic nuclear polarization at high magnetic fields », The Journal of Chemical Physics, vol. 128, no 5, 2008

<sup>39</sup> Reddy et al., « General synthesis of persistent trityl radicals for EPR imaging of biological systems », The Journal of Organic Chemistry, vol. 67, no 14, 12 juillet 2002.

<sup>40</sup> Cheng et al., « Over 35% liquid-state <sup>13</sup>C polarization obtained via dissolution dynamic nuclear polarization at 7 T and 1 K using ubiquitous nitroxyl radicals », Physical chemistry chemical physics: PCCP, vol. 15, no 48, 28 décembre 2013.

<sup>41</sup> Song et al., « TOTAPOL: a biradical polarizing agent for dynamic nuclear polarization experiments in aqueous media », Journal of the American Chemical Society, vol. 128, no 35, 6 septembre 2006.

## G. Objectifs

A l'heure actuelle, l'analyse RMN est un outil très utilisé dans de nombreux domaines. L'étude de la structure et de la dynamique des biomolécules est une nécessité pour comprendre le fonctionnement cellulaire et les mécanismes de certaines pathologies. Toutefois, il a déjà été démontré que l'analyse *in vitro* n'est pas toujours représentative de la réalité. Les équipes de Z. Serber<sup>42</sup> et de P. Selenko<sup>43</sup> ont réalisés des expériences en présence de lysats cellulaires ou en injectant directement les composés dans les cellules. Ils ont ainsi montré qu'il était possible d'avoir des structures différentes et d'observer des interactions entre le composé injecté et les autres biomolécules présentes. Lors de ces analyses, ils ont observés un fort élargissement des raies en présence de cellules vivantes<sup>44</sup>. Ce phénomène peut être expliqué par la faible concentration de la protéine et à la forte viscosité du milieu cellulaire.

Ainsi, il est devenu nécessaire de développer de nouvelles techniques pour permettre l'analyse de biomolécules dans leur milieu naturel: la cellule.

Au cours de ma thèse, je me suis intéressée à l'utilisation et à l'optimisation de quatre techniques :

- 1- Les LLS permettent de suivre la dynamique des protéines et conserver l'aimantation.<sup>45</sup>
- 2- Les LLC permettent d'améliorer la résolution des spectres obtenus.<sup>5</sup>
- 3- La DNP permet d'augmenter la sensibilité du signal.<sup>46,47</sup>
- 4- L'électroporation permettant d'introduire le composé dans les cellules par une impulsion électrique.<sup>48,49</sup>

J'ai appliqué ces méthodologies sur différents systèmes ou phénomènes biologiques :

- un dipeptide **alanine-glycine**, afin de mettre au point les méthodes de LLS et LLC
- une protéine structurée, **l'ubiquitine**, pour optimiser la méthode sur un système plus complexe

---

<sup>42</sup> Serber, et Dötsch. In-cell NMR spectroscopy. *Biochemistry*, 40, 14317-14323 (2001)

<sup>43</sup> Selenko. and Wagner, NMR mapping of protein interactions in living cells. *Nat Methods*. 2006 Feb;3(2):80-1

<sup>44</sup> Selenko et Wagner, *Journal of structural Biology* 158 (2007) 244-253

<sup>45</sup> Pileio, et al.. (2010) Storage of nuclear magnetization as long-lived singlet order in low magnetic field. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107, (40), 17135-17139.

<sup>46</sup> Clarkson et al., *Physics in Medicine and Biology*, Volume 43, Number 7

<sup>47</sup> Lumata, et al. (2011), BDPA: An Efficient Polarizing Agent for Fast Dissolution Dynamic Nuclear Polarization NMR Spectroscopy. *Chem. Eur. J.*, 17: 10825–10827

<sup>48</sup> Teissie et Tsong, Electric field induced transient pores in phospholipid bilayer vesicles. *Biochemistry*. 1981 Mar 17;20(6):1548-54.

<sup>49</sup> Teissie, Rols, Fusion of mammalian cells in culture is obtained by creating the contact between cells after their electroporation. *Biochem Biophys Res Commun*. 1986 Oct 15;140(1):258-66

- une protéine d'intérêt majeur, le **domaine USrc** qui sera présenté dans le chapitre suivant.
- un fluochrome, **alexa fluor 568** qui permet d'observer et de mettre au point la technique d'électroporation
- une petite séquence protéique issue de la séquence d'**IκBα** présentée dans le chapitre suivant, sera utilisée pour étudier la phosphorylation d'un composé au sein des cellules.
- la conversion du **pyruvate** en lactate, une réaction modèle<sup>50</sup>, utilisée ici pour tester les performances de la DNP.

---

<sup>50</sup> Harris et al., « Kinetics of hyperpolarized <sup>13</sup>C1-pyruvate transport and metabolism in living human breast cancer cells », Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, vol. 106, no 43, 27 octobre 2009.



## **Chapitre II**



## II. Systèmes biologiques

---

### A. Domaine N-terminal de la protéine Src issue de Rous Sarcoma Virus (RSV)

Les protéines sont constituées d'enchaînements d'acides aminés formant une séquence peptidique. Cette séquence s'organise dans l'espace afin de former une structure tridimensionnelle permettant à la protéine concernée d'exercer une fonction bien définie. La structure d'une protéine peut être résolue par diffractions des rayons X<sup>51</sup>, mais, dans certains cas, les structures obtenues possèdent des régions dont la structure tridimensionnelle n'a pu être déterminée<sup>52</sup>. La RMN a alors montré que ces régions avaient une grande flexibilité<sup>53, 54</sup>. Or, la flexibilité de ces régions a une importance biologique<sup>55, 56</sup>. Elles peuvent par exemple jouer un rôle dans la transcription, la traduction et dans la transduction du signal cellulaire<sup>57, 58</sup>. Ces régions flexibles sont souvent situées entre deux domaines protéiques permettant ainsi à la protéine de changer de conformation<sup>59</sup>. Ce changement est généralement lié à une transmission de signaux, *e.g.*, phosphorylation, méthylation, sulfonation, glycosylation, etc.<sup>60, 61</sup>

Les protéines intrinsèquement désordonnées (IDPs) sont des protéines qui possèdent une grande flexibilité. En général, cela ne concerne qu'une petite partie de la protéine, et non la protéine dans son ensemble. Dans ce cas on parle de régions intrinsèquement désordonnées (IDR)<sup>62</sup>.

Les IDPs font depuis quelque temps l'objet de nombreuses études scientifiques. Elles sont relativement répandues dans les signalisations cellulaires et impliquées dans les cancers<sup>63, 64, 65</sup>. Des mutations dans ces régions désordonnées peuvent induire une perte importante d'informations menant

---

<sup>51</sup> Kendrew et al., « Structure of myoglobin: A three-dimensional Fourier synthesis at 2 Å resolution », *Nature*, vol. 185, no 4711, 13 février 1960.

<sup>52</sup> Bloomer et al., « Protein disk of tobacco mosaic virus at 2.8 Å resolution showing the interactions within and between subunits », *Nature*, vol. 276, no 5686, 23 novembre 1978.

<sup>53</sup> Muchmore et al., « X-ray and NMR structure of human Bcl-xL, an inhibitor of programmed cell death », *Nature*, vol. 381, no 6580, 23 mai 1996

<sup>54</sup> Berjanskii et Wishart, « NMR: prediction of protein flexibility », *Nature Protocols*, vol. 1, no 2, 2006.

<sup>55</sup> Uversky, « Wrecked regulation of intrinsically disordered proteins in diseases: pathogenicity of deregulated regulators », *Protein Folding, Misfolding and Degradation*, vol. 1, 2014

<sup>56</sup> Tompa et Csermely, « The role of structural disorder in the function of RNA and protein chaperones », *FASEB J.*, vol. 18, 2004.

<sup>57</sup> Dunker et al., « Intrinsic disorder and protein function », *Biochemistry*, vol. 41, 2002.

<sup>58</sup> Tantos et al., « Intrinsic disorder in cell signaling and gene transcription », *Molecular and Cellular Endocrinology*, vol. 348, no 2, 30 janvier 2012.

<sup>59</sup> Dyson et Wright, « Intrinsically unstructured proteins and their functions », *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, vol. 6, no 3, mars 2005.

<sup>60</sup> Stein et al., « Dynamic interactions of proteins in complex networks: a more structured view: A more structured view of interaction dynamics », *FEBS Journal*, vol. 276, no 19, octobre 2009.

<sup>61</sup> Dunker et al., « Identification and functions of usefully disordered proteins », *Advances in Protein Chemistry*, vol. 62, 2002.

<sup>62</sup> Van der Lee et al., « Classification of Intrinsically Disordered Regions and Proteins », *Chemical Reviews*, vol. 114, no 13, 9 juillet 2014

<sup>63</sup> Iakoucheva et al., « Intrinsic disorder in cell-signaling and cancer-associated proteins », *Journal of Molecular Biology*, vol. 323, no 3, 25 octobre 2002.

<sup>64</sup> Uversky et al., « Intrinsically disordered proteins in human diseases: introducing the D2 concept », *Annual Review of Biophysics*, vol. 37, 2008.

<sup>65</sup> Midic et al., « Protein disorder in the human diseaseome: unfoldomics of human genetic diseases », *BMC genomics*, 10 Suppl 1, 2009.

à des modifications au niveau des sites post-traductionnels qui engendrent par la suite des pathologies<sup>66</sup>.

Les IDRs peuvent également se retrouver aux extrémités d'une protéine. C'est le cas, par exemple, de l'extrémité N-terminale de la protéine c-Src. Cette protéine est ubiquitaire. Son implication dans différents cancers<sup>67</sup> en ont fait une cible thérapeutique prometteuse<sup>68, 69</sup>. Son extrémité N-terminale, qui est intrinsèquement désordonnée *in vitro*, suscite un nouvel intérêt de par son rôle clef dans l'activité de la protéine, notamment grâce à son interaction avec la membrane cellulaire<sup>70</sup>. Cette interaction confère à la protéine une conformation particulière nécessaire pour transmettre l'information à ses protéines partenaires *via* des déphosphorylations et des phosphorylations<sup>71</sup>.

La structure cristalline de c-Src a été résolue pour la première fois par l'équipe de Kuriyan et Harrison en 1997<sup>72</sup> sans l'extrémité N-terminale qui, du fait de sa grande flexibilité, empêche toute cristallisation. De ce fait, le domaine N-terminal de c-Src reste encore relativement méconnu. Cependant, la RMN a déjà permis d'analyser la flexibilité et la dynamique de cette partie IDR<sup>73</sup>. De récentes découvertes structurales par l'équipe de Pons et coll. en 2009<sup>74</sup> et 2013<sup>71</sup> sur ce domaine N-terminal donnent une nouvelle vie aux recherches sur ce domaine.

La RMN est une méthode de choix dans l'étude des IDPs<sup>75, 76, 77</sup>, car elle permet d'avoir accès non seulement à des informations structurales mais également à la dynamique de ces domaines<sup>78</sup>. Au cours de mes travaux de thèse, nous avons essayé de développer de nouveaux outils, décrits dans le chapitre 1, pour l'analyse de protéines intrinsèquement désordonnées (IDPs), en prenant pour système d'intérêt l'extrémité N-terminale de c-Src.

---

<sup>66</sup> Li et al., « Loss of post-translational modification sites in disease », Pacific Symposium on Biocomputing. Pacific Symposium on Biocomputing, 2010.

<sup>67</sup> Irby, « Role of Src expression and activation in human cancer », vol. 19, no 49, 20 novembre 2000.

<sup>68</sup> Finn, « Targeting Src in breast cancer », Annals of oncology: official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO, vol. 19, no 8, août 2008.

<sup>69</sup> Mayer et Krop, « Advances in targeting SRC in the treatment of breast cancer and other solid malignancies », Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research, vol. 16, no 14, 15 juillet 2010.

<sup>70</sup> Kaplan et al., « The src protein contains multiple domains for specific attachment to membranes. », Molecular and Cellular Biology, vol. 10, no 3, mars 1990

<sup>71</sup> Pérez et al., « Lipid binding by the Unique and SH3 domains of c-Src suggests a new regulatory mechanism », Scientific Reports, vol. 3, 2013.

<sup>72</sup> Sicheri et Kuriyan, « Structures of Src-family tyrosine kinases », Current opinion in structural biology, vol. 7, no 6, décembre 1997.

<sup>73</sup> Showalter, « Intrinsically Disordered Proteins: Methods for Structure and Dynamics Studies », in EMagRes, 2007.

<sup>74</sup> Pérez et al., « Structural Characterization of the Natively Unfolded N-Terminal Domain of Human c-Src Kinase: Insights into the Role of Phosphorylation of the Unique Domain », Journal of Molecular Biology, vol. 391, no 1, 7 août 2009

<sup>75</sup> Bracken, « NMR spin relaxation methods for characterization of disorder and folding in proteins », Journal of Molecular Graphics and Modelling, vol. 19, no 1, février 2001.

<sup>76</sup> Dyson et Wright, « Nuclear magnetic resonance methods for elucidation of structure and dynamics of disordered states », Methods Enzymol., vol. 339, 2001.

<sup>77</sup> Dyson et Wright, « Insights into the structure and dynamics of unfolded proteins from nuclear magnetic resonance », Adv. Protein Chem., vol. 62, 2002.

<sup>78</sup> Amata et al., « Multi-phosphorylation of the Intrinsically Disordered Unique Domain of c-Src Studied by In-Cell and Real-Time NMR Spectroscopy », ChemBioChem, vol. 14, no 14, 2013

## 1. Historique et découvertes lié à c-Src

En 1911, le pathologiste américain Peyton Rous (1879-1970) isola un virus à partir d'un sarcome de volaille. Il testa sa capacité d'infection et de prolifération en transplantant cette tumeur maligne dans un poulet sain, qui développa à son tour, de nouvelles tumeurs<sup>79</sup>. Ce rétrovirus oncogène, nommé alors RSV pour « Rous Sarcoma Virus » fut un des premiers rétrovirus découverts, et deviendra une future référence dans la recherche des mécanismes moléculaires mis en jeu lors de développements de cancers<sup>80</sup>. Cette découverte valut à Peyton Rous le prix Nobel de médecine en 1966.

A partir des années 1970, l'étude du génome de RSV<sup>81, 82</sup> a permis des découvertes d'importance capitale, par exemple, la structure du gène c-Src qui possède une structure typique d'un gène cellulaire composé d'exons et d'introns<sup>83</sup> (Figure 40).

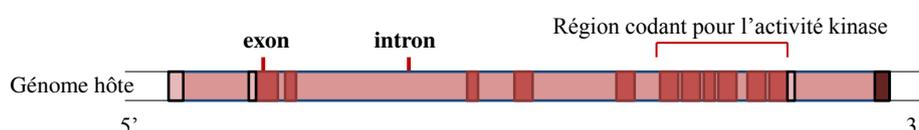


Figure 40 - Schéma de la séquence du gène c-Src d'après Martin<sup>84</sup>

Le terme proto-oncogène, ou oncogène cellulaire, a été introduit par Hurbner et Todaro<sup>85</sup> en 1976, afin de distinguer c-Src des gènes oncogènes, c'est-à-dire ceux d'origine virale. Ces gènes oncogènes sont des mutations de gènes proto-oncogènes qui induisent des développements de tumeurs ou des proliférations cellulaires anormales. Les gènes proto-oncogènes sont, quant à eux, d'origine cellulaire et codent généralement pour des protéines impliquées dans la transduction de signaux pour la prolifération cellulaire. c-Src est le précurseur cellulaire du gène viral du rétrovirus transformé v-Src. Malgré ces importantes découvertes concernant le gène c-Src, ainsi que la séquence peptidique de sa protéine, les relations entre sa structure et sa fonction n'ont été identifiées que plus tardivement<sup>86</sup>.

En 1980, les laboratoires de Bishop et Erikson ont démontré que la protéine c-Src appartenait aux protéines ayant une activité tyrosine kinase comme les EGFR (récepteurs du facteur de croissance

<sup>79</sup> Rous, « A Sarcoma of the Fowl Transmissible by an Agent Separable from the Tumor Cells », *The Journal of Experimental Medicine*, vol. 13, no 4, 4 janvier 1911.

<sup>80</sup> Kurth et Bannert, « Beneficial and detrimental effects of human endogenous retroviruses », *International Journal of Cancer. Journal International Du Cancer*, vol. 126, no 2, 15 janvier 2010.

<sup>81</sup> Martin, « Rous sarcoma virus: a function required for the maintenance of the transformed state », *Nature*, vol. 227, no 5262, 5 septembre 1970 ;

<sup>82</sup> Toyoshima et al., « The reproductive and cell-transforming capacities of avian sarcoma virus B77 », *Inactivation with UV Light*, *Virology*, 42 (1970), 163–70.

<sup>83</sup> Takeya et Hanafusa, « Structure and sequence of the cellular gene homologous to the RSV Src gene and the mechanism for generating the transforming virus », *Cell*, vol. 32, no 3, mars 1983.

<sup>84</sup> Martin, « TIMELINE: The hunting of the Src », *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, vol. 2, no 6, juin 2001.

<sup>85</sup> Huebner et Todaro, « Oncogenes of RNA tumor viruses as determinants of cancer », *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 64, no 3, novembre 1969.

<sup>86</sup> Smart et al., « Characterization of sites for tyrosine phosphorylation in the transforming protein of Rous sarcoma virus (pp60v-src) and its normal cellular homologue (pp60c-src) », *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 78, no 10, octobre 1981.

épidermique)<sup>87</sup>, récepteurs surexprimés dans certains types de cancer. Bien que cette protéine ait une activité tyrosine kinase, elle ne possède pas la même structure que les récepteurs membranaires. Elle est souvent retrouvée dans le cytoplasme, en interaction avec la membrane mais n'est en aucun cas transmembranaire. Elle possède une structure composée de plusieurs domaines (au nombre de sept) dont quatre appelés Src homology (SHx). La composition et la structure de c-Src seront discutées dans la partie suivante.

En résumé de cette partie « Historique et Découvertes », le schéma ci-dessous (Figure 41) répertorie les dates des découvertes liées à Src de 1911 à nos jours.

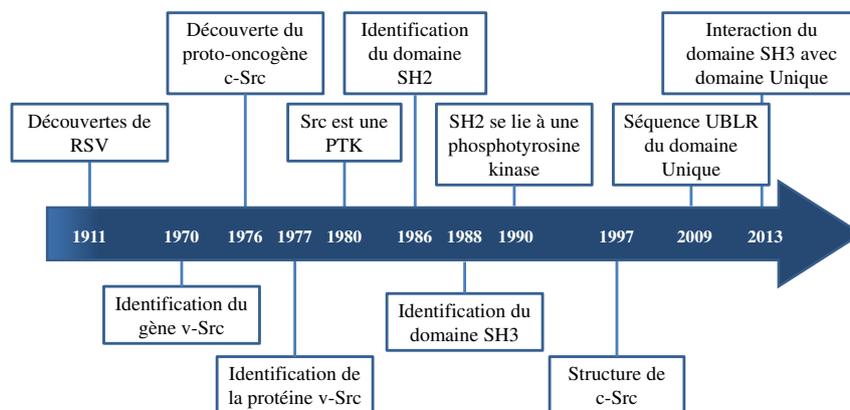


Figure 41 - Les dates importantes des découvertes liées à c-Src

## 2. Fonction et organisation de la protéine c-Src

### a. Fonctions de c-Src dans la cellule

- *Les différents rôles de c-Src*

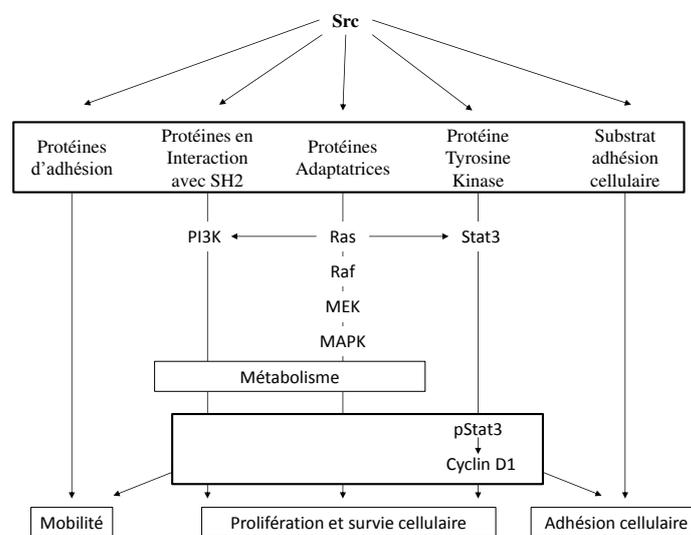
La protéine c-Src est souvent associée aux membranes cellulaires telles que la membrane plasmique ou la membrane nucléaire. Au niveau de la membrane plasmique, la protéine c-Src s'associe à des récepteurs afin de transmettre les signaux cellulaires. Par exemple, elle s'associe avec le récepteur PDGF (*Platelet-Derived Growth Factor*) lors de la prolifération ou la croissance de fibroblastes<sup>88</sup>. Dans le noyau, elle aide à la régulation des cycles cellulaires en interagissant avec d'autres protéines<sup>89</sup>, telles que PI3-K (*Phosphoinositide 3-kinase*), impliquée dans la régulation de la

<sup>87</sup> Levinson et al., « Evidence that the transforming gene of avian sarcoma virus encodes a protein kinase associated with a phosphoprotein », *Cell*, vol. 15, no 2, octobre 1978.

<sup>88</sup> Kypta et al., « Association between the PDGF receptor and members of the src family of tyrosine kinases », *Cell*, vol. 62, no 3, 10 août 1990

<sup>89</sup> Shalloway et al., « C-Src and mitosis », *Ciba Foundation Symposium*, vol. 170, 1992.

synthèse de l'ADN, la différenciation ou la survie cellulaire. La protéine c-Src interagit grâce à son activité tyrosine kinase avec la protéine STAT3 (*Signal Transducer and Activator of Transcription 3*) qui est un facteur de transcription. Cette interaction permet d'augmenter la transcription de l'ADN et donc d'aider à la survie cellulaire<sup>90</sup>. c-Src est également retrouvée dans le cytoplasme au niveau des jonctions adhérentes des cellules, en interaction avec la protéine FAK (*Focal Adhesion Kinase*)<sup>91</sup> ou Cas (*Crk and Src associated substrate*)<sup>92</sup>. Ces deux protéines sont importantes dans la migration cellulaire, la morphologie et l'adhésion cellulaire. Grâce à son activité tyrosine kinase, elle est capable de réguler l'activité de nombreuses protéines lors de réaction de phosphorylation, telle que la protéine RAS<sup>93</sup> qui est aussi une protéine proto-oncogène impliquée dans la migration cellulaire et la mitose (Figure 42).



**Figure 42 - Différentes interactions cellulaires de c-Src, d'après Martin<sup>84</sup>**  
**MAPK (*Mitogen activated protein kinase*), MEK (*Mitogen activated protein kinase kinase 1*)**

La protéine c-Src possède une multitude de substrats ce qui lui permet d'avoir une activité de régulation dans de nombreux domaines : l'adhésion, la mobilité, l'invasion et la prolifération cellulaire. Tous ces domaines sont importants dans le processus de survie cellulaire mais ils sont également impliqués dans la régulation, dans le cas des cellules cancéreuses.

- *c-Src et cancer*

<sup>90</sup> Yu et al., « Enhanced DNA-binding activity of a Stat3-related protein in cells transformed by the Src oncoprotein », *Science* (New York, N.Y.), vol. 269, no 5220, 7 juillet 1995.

<sup>91</sup> Carragher et al., « A novel role for FAK as a protease-targeting adaptor protein: regulation by p42 ERK and Src », *Current biology: CB*, vol. 13, no 16, 19 août 2003.

<sup>92</sup> Sastry et Burridge, « Focal adhesions: a nexus for intracellular signaling and cytoskeletal dynamics », *Experimental Cell Research*, vol. 261, no 1, 25 novembre 2000.

<sup>93</sup> Jalali et al., « Shear stress activates p60src-Ras-MAPK signaling pathways in vascular endothelial cells », *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, vol. 18, no 2, février 1998.

Parmi toutes les protéines de la famille des PTKs non récepteurs, c-Src est la protéine la plus étudiée dans les cancers<sup>94</sup>. Cette protéine est nécessaire à la fois à la survie de la cellule mais aussi aux processus de mort cellulaire. A titre d'exemple, elle est présente lors de la division cellulaire des fibroblastes<sup>95</sup>. c-Src contribue au développement de cellules cancéreuses, mais n'est pas responsable de la transformation de cellules saines en cellules cancéreuses. En étroite interaction avec les récepteurs EGFR, elle régule l'invasion des cellules cancéreuses dans le cas d'un cancer du côlon, mais n'influence pas la prolifération de ces cellules<sup>96</sup>. On constate également la surexpression de cette protéine proto-oncogène lors de la perte de l'équilibre cellulaire (homéostasie)<sup>67</sup>. Elle a une forte activité dans de nombreux cancers : poumons, côlon, seins, pancréas, foie, etc<sup>97</sup>. Sa forte surexpression et sa forte activité ne sont pas seulement dues à un problème de régulation intramoléculaire, mais également à la sous-expression de la protéine CSK, qui a une activité inhibitrice sur c-Src lors d'une régulation normale dans les cellules saines<sup>98</sup>.

Du fait de son implication et de sa présence dans plusieurs types de cellules cancéreuses, c-Src, protéine proto-oncogène, fait l'objet de nombreuses recherches. Elle est la cible de nouvelles thérapies dans le but de freiner, voire d'empêcher la prolifération des cellules cancéreuses<sup>99</sup>.

## b. Organisation de c-Src

- *Homologie de séquence entre v-Src et c-Src*

Le terme « SRC » désigne la famille de gènes proto-oncogènes codant pour des tyrosines kinases Src. La protéine proto-oncogène c-Src (60 kDa), dénommée p60<sup>c-Src</sup> <sup>87, 100</sup>, possède, comme son homologue viral v-Src, des propriétés de tyrosine-kinase<sup>101, 102</sup>. Cette protéine est retrouvée dans tous les types cellulaires et une simple mutation ou délétion de sa séquence peptidique peut avoir de conséquences pathologiques liées aux cancers<sup>103</sup>. C'est pour cette raison que la protéine est appelée proto-oncogène. Elle possède une structure proche de son homologue viral oncogène, v-Src, les différences majeures résidant dans l'absence du domaine unique et du domaine de régulation au

---

<sup>94</sup> Yeatman, « A renaissance for SRC », *Nature Reviews Cancer*, vol. 4, no 6, 2004

<sup>95</sup> Roche et al., « Requirement for Src family protein tyrosine kinases in G2 for fibroblast cell division », *Science (New York, N.Y.)*, vol. 269, no 5230, 15 septembre 1995.

<sup>96</sup> Brunton et al., « A role for epidermal growth factor receptor, c-Src and focal adhesion kinase in an in vitro model for the progression of colon cancer », *Oncogene*, vol. 14, no 3, 23 janvier 1997.

<sup>97</sup> Dunn, « The role of Src in solid tumors », *The oncologist*, vol. 14, no 7, 2009.

<sup>98</sup> Masaki et al., « Reduced C-terminal Src kinase (Csk) activities in hepatocellular carcinoma », *Hepatology (Baltimore, Md.)*, vol. 29, no 2, février 1999.

<sup>99</sup> Blake et al., « SU6656, a selective src family kinase inhibitor, used to probe growth factor signaling », *Molecular and Cellular Biology*, vol. 20, no 23, décembre 2000.

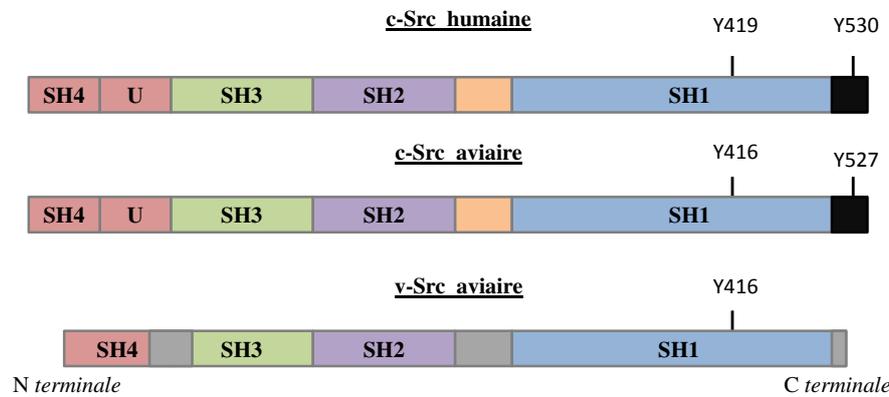
<sup>100</sup> Sefton, et al 'Comparison of the Expression of the Src Gene of Rous Sarcoma Virus in Vitro and in Vivo', *Journal of Virology*, 28 (1978), 957-71.

<sup>101</sup> Collett et Erikson, « Protein kinase activity associated with the avian sarcoma virus Src gene product », *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 75, no 4, avril 1978

<sup>102</sup> Sefton et al., « Product of in vitro translation of the Rous sarcoma virus src gene has protein kinase activity », *J. Virol.* 1979, 30 (1), 311-318.

<sup>103</sup> Takeya et Hanafusa, « DNA sequence of the viral and cellular src gene of chickens. II. Comparison of the src genes of two strains of avian sarcoma virus and of the cellular homolog. », *Journal of Virology*, vol. 44, no 1, 10 janvier 1982

niveau de l'extrémité C-terminale chez l'oncogène, en noir sur la Figure 43, ce qui lui confère une haute activité (Figure 43)<sup>104</sup>.



**Figure 43 - Homologie de structure de c-Src humaine, aviaire et v-Src aviaire Yeatman et coll.<sup>94</sup>**

**Le domaine de régulation, représenté en noir, n'est présent que dans c-Src, et le terme U désigne le domaine Unique**

La numérotation des acides aminés utilisée dans ce manuscrit suit à celle de la c-Src d'origine humaine.

#### • Généralités sur la protéine c-Src

c-Src appartient à la famille des Protéines Tyrosine Kinases (PTKs). Il existe différentes sous familles de PTKs : les PTKs liées aux facteurs de croissance et de différenciation cellulaire, les PTKs liées à l'adhérence cellulaire et les PTKs présentes dans le cytoplasme<sup>105</sup>. Ces trois sous familles de PTKs sont réparties selon leur localisation dans la cellule, en deux catégories (Figure 44) :

- **les PTKs récepteurs** sont transmembranaires, elles possèdent une partie extracellulaire et une partie intracellulaire
- **les PTKs non récepteurs** sont localisées dans le cytoplasme et adhèrent à la membrane plasmique

<sup>104</sup> Jove et Hanafusa, « Cell transformation by the viral Src oncogene », Annual Review of Cell Biology, vol. 3, 1987.

<sup>105</sup> Bolen, « Nonreceptor tyrosine protein kinases », Oncogene, vol. 8, no 8, août 1993.

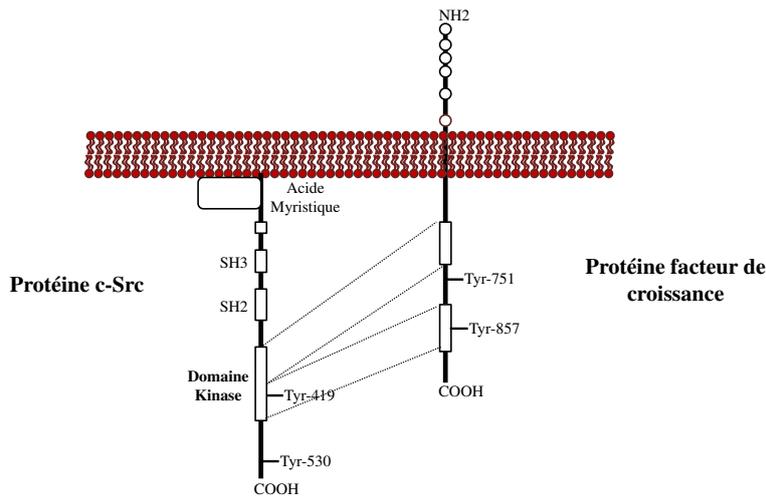


Figure 44 - Exemple de deux familles de PTKs : PTKs récepteurs (droite) et PTKs non récepteurs (gauche) d'après Cantley et coll.<sup>106</sup>

La protéine c-Src appartient à la famille des PTKs non récepteurs<sup>72</sup>. c-Src est ubiquitaire et présente dans de nombreux tissus, contrairement aux autres protéines, telles que Hck (*Hematopoietic cell kinase*) et Lck (*Lymphoïde cell kinase*), qui restent spécifiques de leur type cellulaire. Ces PTKs étant non récepteurs, ils nécessitent un intermédiaire récepteur, tel que les GFR (*Growth Factor Receptor*) qui leurs transmettent des signaux extracellulaires. Ces protéines kinases jouent donc un rôle clef dans la signalisation cellulaire.

Les PTKs non récepteurs possèdent une structure générale homologue de l'extrémité C-terminale vers l'extrémité N-terminale : un domaine régulateur et un domaine kinase (**SH1**), deux domaines d'interactions protéiques (SH2 et SH3) ainsi qu'un domaine en interaction avec la membrane plasmique (Figure 45).

Ce n'est qu'en 1986 que Tony et coll. décrivent et nomment la région homologue adjacente au domaine catalytique (SH1, Src homologue 1) comme étant le domaine **SH2**, pour Src homologue 2<sup>107</sup>. L'équipe de Pawson met en évidence en 1990 que ce domaine SH2 se lie à un peptide phosphotyrosine *in vitro*<sup>108</sup>.

Le domaine appelé **SH3** a été découvert en 1988 par Mayer et Hanafusa. Ils ont noté une homologie de séquence entre la région contiguë avec SH2 et la protéine Crk. Cette dernière est une protéine issue d'une modification du clonage de sarcoma virus aviaire créée par Mayer<sup>109</sup>.

<sup>106</sup> Cantley et al., « Oncogenes and signal transduction », Cell, vol. 64, no 2, 1991.

<sup>107</sup> Sadowski et al., « A noncatalytic domain conserved among cytoplasmic protein-tyrosine kinases modifies the kinase function and transforming activity of Fujinami sarcoma virus P130gag-fps », Molecular and Cellular Biology, vol. 6, no 12, décembre 1986.

<sup>108</sup> Moran et al., « Src homology region 2 domains direct protein-protein interactions in signal transduction. », Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, vol. 87, no 21, novembre 1990.

<sup>109</sup> Mayer et al., « A novel viral oncogene with structural similarity to phospholipase C », Nature, vol. 332, no 6161, 17 mars 1988.

L'extrémité N-terminale est encore très peu connue. On sait, cependant, qu'elle interagit avec la membrane plasmique et qu'elle joue un rôle dans l'activité de la protéine c-Src.

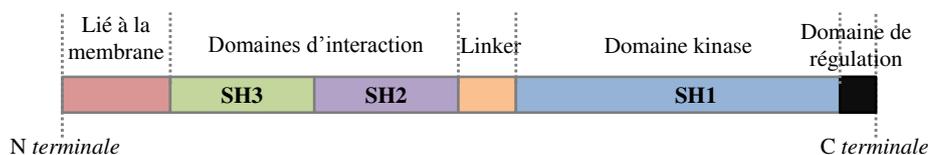


Figure 45 - Structure générale des Src d'après Martin et coll.<sup>84</sup>

• *Extrémité C-terminale*

L'extrémité C-terminale est le plus grand domaine de la protéine c-Src ; elle compte plus de 250 résidus (267 à 540 chez la c-Src humaine). Cette région est composée de deux parties :

- le **domaine kinase**, appelé aussi domaine **SH1** (*Src Homology domains 1*), en bleu sur la Figure 45
- le **domaine de régulation** de l'activité tyrosine kinase, en noir sur la Figure 45

Le domaine SH1 est constitué de deux sous-unités. La première « petite boucle » ou « N-lobe », comprend les résidus 267 à 337 (Figure 46). Elle possède majoritairement une structure secondaire composée de feuillets  $\beta$ . La deuxième sous-unité est appelée « grande boucle » ou « C-lobe » (résidus 341 à 520) et est constituée principalement d'hélices  $\alpha$  (Figure 46 et Figure 47)<sup>110</sup>.

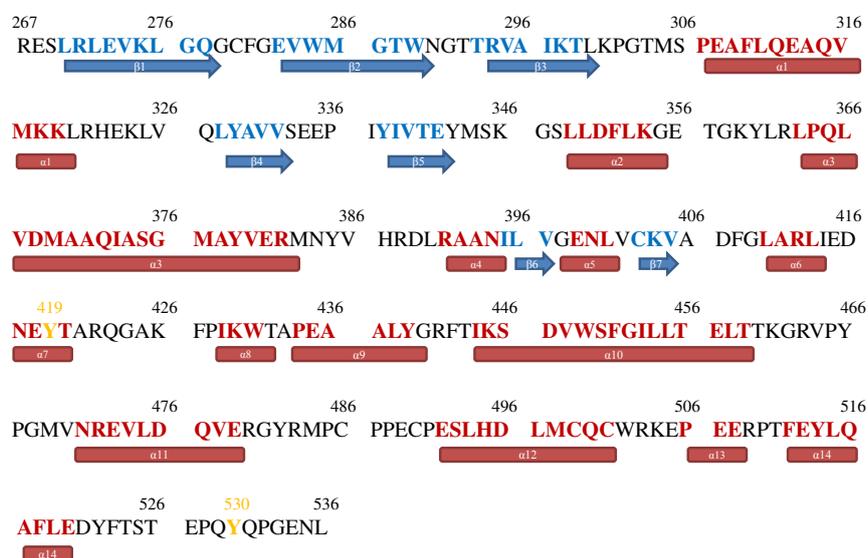
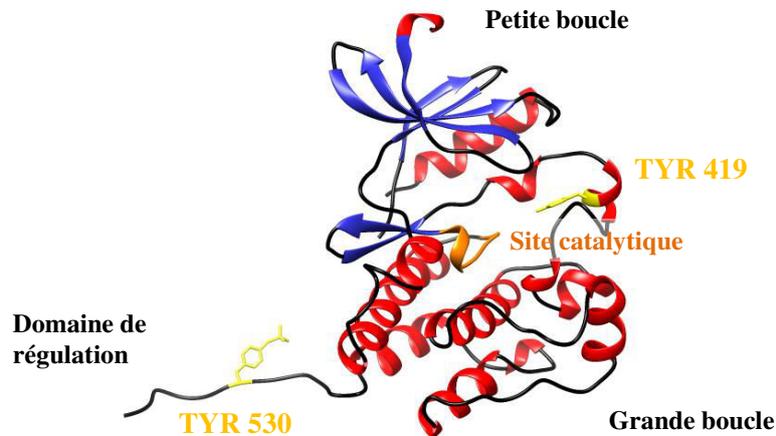


Figure 46 - Séquence peptidique du domaine SH1 avec des informations sur la structure secondaire, d'après Sichi et coll.<sup>72</sup> : Les hélices  $\alpha$  sont représentées en rouge et les feuillets  $\beta$  en bleu. Mise en évidence en jaune des deux tyrosines

Le domaine SH1 est responsable de l'activité tyrosine kinase : la tyrosine 419, clef de l'activité kinase, est localisée entre ces deux sous-unités. Une autre tyrosine joue un rôle important dans l'activation de

<sup>110</sup> Xu et al., « Three-dimensional structure of the tyrosine kinase c-Src », Nature, vol. 385, no 6617, 13 février 1997.

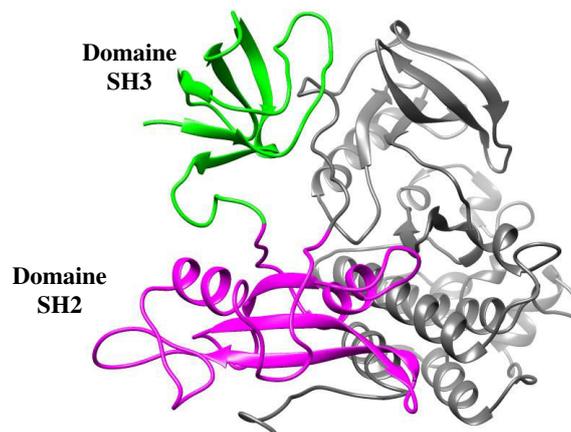
cette protéine, la tyrosine 530 située au niveau du domaine de régulation à l'extrémité C-terminale, à 40 Å du site catalytique (Figure 47).



**Figure 47 - Structure tridimensionnelle du domaine kinase SH1 et domaine de régulation (PDB : 2SRC)**  
 Les hélices  $\alpha$  sont représentées en rouge, les feuillets  $\beta$  en bleu et le domaine catalytique « HRDLRAAN » en orange.

- *Domaines d'interactions protéiques : SH2 et SH3*

Dans les cellules, la transduction du signal cellulaire nécessite de passer par des récepteurs transmembranaires (tels que EGF, PDGF), associés à des tyrosines kinases<sup>106, 111</sup>. Ces dernières possèdent deux domaines d'interactions protéiques, SH2 et SH3 (*Src Homology domains 2 & 3*)<sup>112</sup> situés au centre de la protéine (Figure 48).



**Figure 48 – Structure tridimensionnelle des domaines d'interaction : SH2 en violet et SH3 en vert (PDB : 2SRC)**

Ces deux domaines ont des fonctions différentes : SH2 se lie à des résidus tyrosines phosphorylés<sup>113, 114</sup> tandis que SH3 a une haute affinité pour des peptides riches en proline et en acides

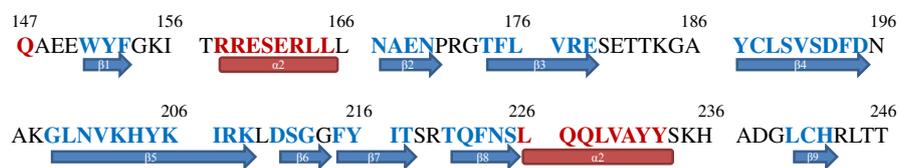
<sup>111</sup> Schlessinger et Ullrich, « Growth factor signaling by receptor tyrosine kinases », *Neuron*, vol. 9, no 3, septembre 1992.

<sup>112</sup> Pawson et Schlessingert, « SH2 and SH3 domains », *Current biology: CB*, vol. 3, no 7, 1 juillet 1993.

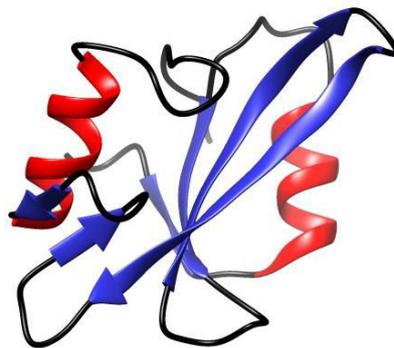
<sup>113</sup> Songyang et al., « SH2 domains recognize specific phosphopeptide sequences », *Cell*, vol. 72, no 5, 12 mars 1993.

aminés hydrophobes<sup>115</sup>. Cette capacité qu'ont SH2 et SH3 à faire des interactions protéine-protéine avec leurs partenaires<sup>108</sup> permet la régulation de l'activité de la protéine c-Src, jouant ainsi un rôle important dans la transmission du signal cellulaire<sup>116</sup>.

Le domaine SH2 possède environ 100 acides aminés et comprend les résidus 148 à 245 (Figure 49). Cette séquence peptidique comporte plusieurs feuillets  $\beta$  et hélices  $\alpha$  (Figure 49 et Figure 50). Le domaine SH2 se lie spécifiquement à une phosphotyrosine présente dans certains peptides mais aussi à une petite séquence de l'extrémité C-terminale de la protéine c-Src constituée des résidus 3 à 6. Il a été montré que le motif qui a le plus d'affinité avec le domaine SH2 est le motif « PQpYEEI »<sup>113, 117, 118</sup>. Le domaine SH2 se lie aussi au domaine SH1 par des interactions électrostatiques entre une hélice du domaine SH2 et une hélice du domaine SH1.



**Figure 49 - Séquence peptidique du domaine SH2 avec informations sur la structure secondaire d'après Sicheri et coll.<sup>72</sup> Les hélices  $\alpha$  sont représentées en rouge et les feuillets  $\beta$  en bleu.**



**Figure 50 - Structure tridimensionnelle du domaine SH2 de c-Src (PDB : 1SHA)  
Les hélices  $\alpha$  sont représentées en rouge et les feuillets  $\beta$  en bleu.**

Le domaine SH3 possède 60 acides aminés (86 à 147) (Figure 51). Il est contigu au domaine SH2. Le domaine SH3 possède une structure secondaire simple : 5 feuillets  $\beta$  antiparallèles et une petite hélice  $\alpha$  près du domaine SH2 (Figure 51 et Figure 52).

<sup>114</sup> Songyang et al., « The phosphotyrosine interaction domain of SHC recognizes tyrosine-phosphorylated NPXY motif », *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 270, no 25, 23 juin 1995.

<sup>115</sup> Ren et al., « Identification of a ten-amino acid proline-rich SH3 binding site », *Science (New York, N.Y.)*, vol. 259, no 5098, 19 février 1993.

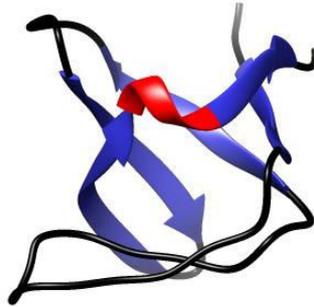
<sup>116</sup> Koch et al., « SH2 and SH3 domains: elements that control interactions of cytoplasmic signaling proteins », *Science (New York, N.Y.)*, vol. 252, no 5006, 3 mai 1991.

<sup>117</sup> Waksman, « Binding of a high affinity phosphotyrosyl peptide to the Src SH2 domain », *Cell* 1993, 72 (5), 779–790.

<sup>118</sup> Waksman et Kuriyan, « Structure and specificity of the SH2 domain », *J. Cell* 2004, 116 (2 Suppl), S45–S48, 3 p following S48.



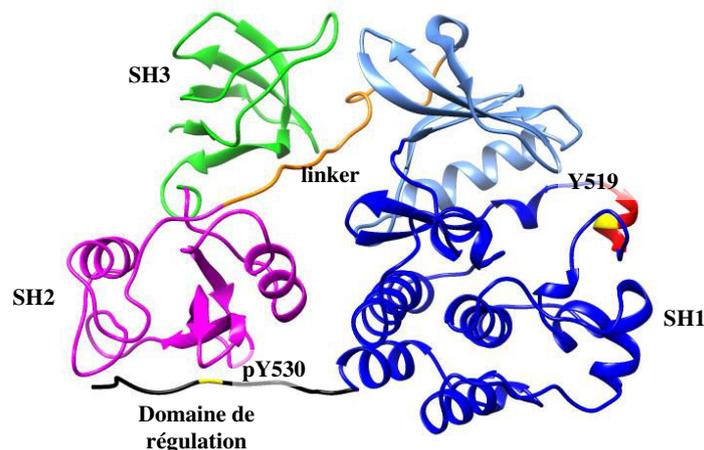
**Figure 51 - Séquence peptidique du domaine SH3 avec informations sur la structure secondaire d'après Sichi et coll.<sup>72</sup> Les hélices  $\alpha$  sont représentées en rouge et les feuillets  $\beta$  en bleu.**



**Figure 52 - Structure tridimensionnelle du domaine SH3 de c-Src (PDB : 3SEM)**

Les hélices  $\alpha$  sont représentées en rouge et les feuillets  $\beta$  en bleu.

Le domaine SH3 interagit avec des peptides qui possèdent une séquence riche en prolines, « PXXPXR »<sup>115, 119</sup>. Cette interaction est en compétition avec une autre : celle du domaine SH3 avec le domaine kinase (SH1) *via* un « linker » (14 résidus) situé entre le domaine SH2 et le domaine SH1 (Figure 45)<sup>72</sup>. Ce « linker » présente un motif « PXXPXR » entre les résidus 246 et 259<sup>110</sup>, ce qui lui permet d'interagir avec le domaine SH3 sur une face, et le domaine SH1 (le petit lobe) sur l'autre face. Le « linker » est ainsi pris en « sandwich » entre les deux domaines, ce qui permet à la protéine d'être repliée sur elle-même (Figure 53).



**Figure 53 - Structure cristalline de la protéine c-Src sous forme inactive selon Xu et coll.<sup>120</sup> (PDB : 2SRC)**

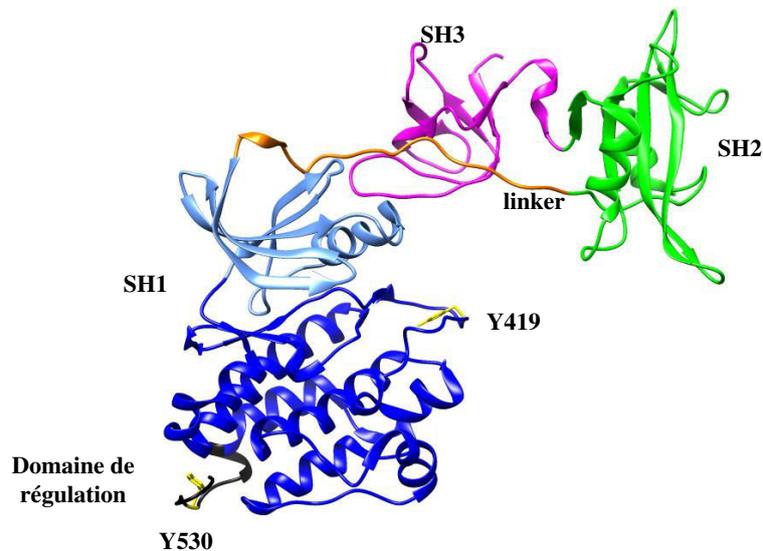
Le domaine SH3 est représenté en vert, le domaine SH2 en violet, le « linker » en orange, le domaine kinase en bleu, le domaine de régulation en noir et les deux résidus Y419 et pY530 en jaune, et la « boucle-hélice » en rouge.

<sup>119</sup> Yu et al., « Solution structure of the SH3 domain of Src and identification of its ligand-binding site », Science (New York, N.Y.), vol. 258, no 5088, 4 décembre 1992

<sup>120</sup> Xu et al., « Crystal Structures of c-Src Reveal Features of Its Autoinhibitory Mechanism », Molecular Cell, vol. 3, no 5, 1999.

La Figure 54 montre la structure tridimensionnelle de c-Src dans une conformation repliée. Celle-ci est sous sa forme inactive, car les domaines SH3 et SH1 interagissent entre eux grâce au « linker » qui est ainsi piégé. Leurs sites d'interactions ne sont plus libres. De plus, la partie « boucle-hélice » cache la tyrosine 519 à l'intérieur de la protéine, elle ne peut donc pas être phosphorylée par une kinase.

En 2005, Cowan Jacob et coll.<sup>121</sup> ont résolu une structure de c-Src dans une conformation ouverte, avec la tyrosine 530 non phosphorylée (Figure 54).



**Figure 54 - Structure cristalline de c-Src déphosphorylée de Cowan Jacob et coll.<sup>121</sup> (PDB : 1Y57)**

**Le domaine SH3 est représenté en vert, le domaine SH2 en violet, le « linker » en orange, le domaine kinase en bleu, le domaine de régulation en cyan et les deux résidus Y419 et Y530 en jaune**

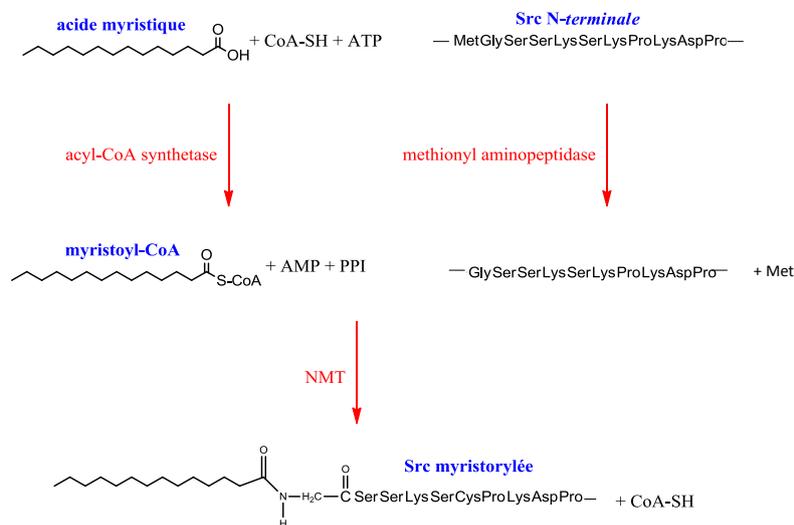
La Figure 54 montre que l'absence de la phosphorylation de Y530 induit l'ouverture de la protéine, le domaine SH2 n'est plus en interaction avec le domaine de régulation (extrémité C-terminale). Les domaines SH2 et SH3 subissent une rotation de 130° par rapport à la forme inactive. Seuls le domaine SH3 et le « linker » sont en contact avec la petite boucle du domaine SH1 (et, plus précisément, l'hélice  $\alpha$ ). Le domaine SH3 reste lié au « linker », comme dans la forme inactive, contrairement au domaine SH2 qui est libre d'interagir avec d'autres protéines<sup>121</sup>.

Le domaine N-terminal, empêchant la protéine de cristalliser, est absent dans la structure résolue par rayons X, bien qu'il joue un rôle majeur dans l'activité de c-Src.

<sup>121</sup> Cowan-Jacob et al., « The Crystal Structure of a c-Src Complex in an Active Conformation Suggests Possible Steps in c-Src Activation », Structure, vol. 13, no 6, juin 2005.



Kamps et coll. ont mis en évidence cette propriété<sup>129</sup>. Afin que la glycine soit myristoylée, le myristoyl-CoA doit d'abord être formé à partir de l'acide myristique, puis la protéine devra être clivée au niveau de son premier acide aminé, la méthionine. Dans l'étape suivante, la catalyse de la myristoylation est assurée par la protéine N-myristoyl transférase (NMT)<sup>130</sup>, (Figure 56).



**Figure 56 - Réaction de myristoylation sur la glycine de l'extrémité N-terminale de c-Src, d'après Toraskar et coll.** <sup>131</sup>

Dans une majorité de cas, la myristoylation seule n'est pas suffisante pour qu'une protéine interagisse avec la membrane, il s'agit en fait d'un premier signal. Il est nécessaire d'avoir un second signal qui, dans le cas de la protéine c-Src, est donné par le motif lysine « *myr*-GLY-X-X-LYS-X-LYS-X-LYS-X-X » avec trois lysines en position 5, 7 et 9 (Figure 57)<sup>132, 133, 134, 135</sup> dans la séquence peptidique. Cette séquence est capable de réaliser des interactions électrostatiques avec la membrane et renforcer ainsi la liaison protéine - membrane<sup>125, 135, 136</sup>. Elle est retrouvée chez plusieurs membres de la famille Src (Figure 57)

<sup>129</sup> Kamps et al., « Mutation of NH<sub>2</sub>-terminal glycine of p60Src prevents both myristoylation and morphological transformation », Proceedings of the National Academy of Sciences, vol. 82, no 14, 7 janvier 1985.

<sup>130</sup> Farazi et al., « The Biology and Enzymology of Protein N-Myristoylation », Journal of Biological Chemistry, vol. 276, no 43, 26 octobre 2001.

<sup>131</sup> Prasad et al., « N-myristoyltransferase: a novel target », Mini Reviews in Medicinal Chemistry, vol. 8, no 2, février 2008.

<sup>132</sup> Silverman et al., « Members of the Src family of nonreceptor tyrosine kinases share a common mechanism for membrane binding », Cell Growth & Differentiation: The Molecular Biology Journal of the American Association for Cancer Research, vol. 4, no 6, juin 1993.

<sup>133</sup> Silverman et Resh, « Lysine residues form an integral component of a novel NH<sub>2</sub>-terminal membrane targeting motif for myristylated pp60v-src. », J. Cell Biol. 1992, 119 (2), 415-425.

<sup>134</sup> Kaplan et al., « The first seven amino acids encoded by the v-src oncogene act as a myristoylation signal », Mol. Cell. Biol. 1988, 8 (6), 2435.

<sup>135</sup> Resh, « Fatty acylation of proteins: new insights into membrane targeting of myristoylated and palmitoylated proteins », Biochimica Et Biophysica Acta, vol. 1451, no 1, 12 août 1999.

<sup>136</sup> Resh, « Palmitoylation of ligands, receptors, and intracellular signaling molecules », Science's STKE: signal transduction knowledge environment, vol. 2006, no 359, 31 octobre 2006.

	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
<b>SRC</b>	<i>myr-GLY</i>	SER	SER	LYS	SER	LYS	PRO	LYS	ASP	PRO
<b>LYN</b>	<i>myr-GLY</i>	CYS	ILE	LYS	SER	LYS	GLY	ASP	SER	SER
<b>YES</b>	<i>myr-GLY</i>	CYS	ILE	LYS	SER	LYS	GLY	ASP	LYS	GLY
<b>FYN</b>	<i>myr-GLY</i>	CYS	VAL	GLN	CYS	LYS	ASP	LYS	GLU	ALA
<b>HCK</b>	<i>myr-GLY</i>	CYS	MET	LYS	SER	LYS	PHE	LEU	GLN	VAL
<b>BLK</b>	<i>myr-GLY</i>	LEU	LEU	SER	SER	LYS	ARG	GLN	VAL	SER
<b>KCK</b>	<i>myr-GLY</i>	CYS	VAL	CYS	SER	SER	ASN	PRO	GLU	ASP

**Figure 57 - La myristoylation et le motif lysine présent dans plusieurs membres de la famille Src, d'après Silverman et coll.<sup>132</sup>.**

L'équipe de Buss a montré que la présence de myristoylation est déterminante pour l'interaction de la protéine c-Src avec la membrane<sup>137</sup>. En absence de myristoylation, la protéine est libre dans le cytoplasme. Elle a également démontré que l'absence de l'acide myristique sur la glycine a peu d'influence sur l'activité tyrosine kinase<sup>137, 138</sup>. Généralement la myristoylation d'une protéine a essentiellement un rôle dans sa stabilisation tridimensionnelle, ce qui par exemple a déjà été montré dans le cas de la sous-unité de la protéine kinase c-AMP dépendante<sup>139</sup>.

- *Le domaine « unique » (70 aa)*

Comme son nom l'indique, ce domaine unique est spécifique et différent pour chacun des membres des PTKs non récepteurs. Sa séquence peptidique est connue, mais sa structure secondaire n'a pas été déterminée. En effet, cette partie est définie par une grande flexibilité et appartient aux domaines protéiques dits intrinsèquement désordonnés (*Intrinsically Disordered Proteins* – « IDPs » ou *Intrinsically Disordered Regions* – « IDRs »)<sup>140</sup>. Différentes études *in vitro* de cette région ont déjà prouvé que cette séquence était dépourvue de structure secondaire<sup>62</sup>. Le domaine « unique » est encore très peu connu et fait l'objet de nombreuses recherches.

## b. Les découvertes sur l'extrémité N-terminale

- *La myristoylation*

La comparaison des spectres RMN de c-Src déphosphorylée et phosphorylée tout deux en présence de l'acide myristique montre que l'acide gras se lie à la protéine uniquement si celle-ci est phosphorylée<sup>121</sup>.

<sup>137</sup> Buss et al., « The absence of myristic acid decreases membrane binding of p60Src but does not affect tyrosine protein kinase activity », *Journal of Virology*, vol. 58, no 2, mai 1986.

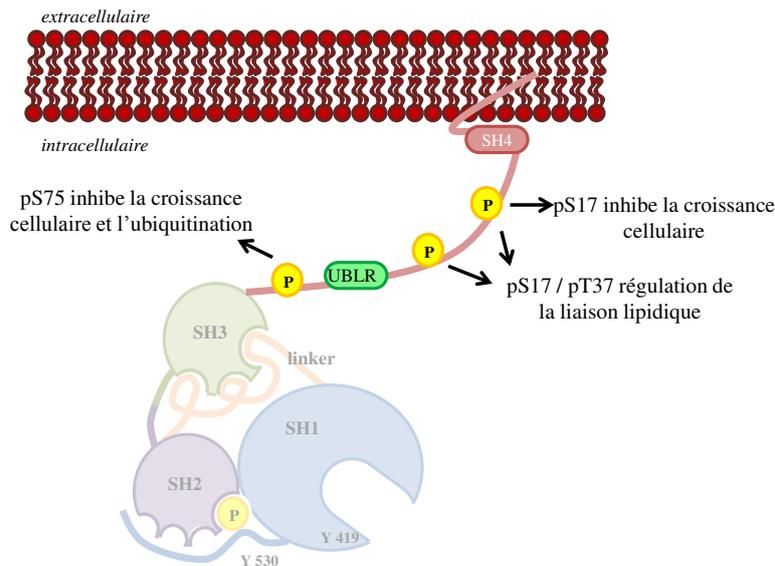
<sup>138</sup> Linder et Burr, « Nonmyristoylated p60v-src fails to phosphorylate proteins of 115-120 kDa in chicken embryo fibroblasts », *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 85, no 8, avril 1988.

<sup>139</sup> Zheng et al., « Crystal structures of the myristylated catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase reveal open and closed conformations », *Protein Science: A Publication of the Protein Society*, vol. 2, no 10, octobre 1993.

<sup>140</sup> Kathiriya et al., « Presence and utility of intrinsically disordered regions in kinases », *Molecular bioSystems*, vol. 10, no 11, novembre 2014.

- *Les phosphorylations*

Les modifications post-traductionnelles ont un rôle crucial dans la régulation d'une protéine<sup>141</sup>. Parmi elles, la phosphorylation est la modification la plus fréquemment impliquée dans la signalisation cellulaire<sup>142</sup>. Les résidus qui subissent les phosphorylations sont la tyrosine, la sérine et la thréonine. Il est possible de suivre ces phosphorylations *in situ* par RMN<sup>143</sup>. Plusieurs travaux de recherche ont montré l'importance de trois résidus présents sur le domaine unique : **S17**, **T37** et **S75**. La sérine 17 est phosphorylée par la PKA (Protéine Kinase cAMP dépendante) tandis que les deux autres acides aminés (T37 et S75) sont phosphorylés par des kinases cycline dépendantes (Cdk1 ou 5). Leur phosphorylation perturbe l'interaction entre le domaine SH2 et la tyrosine 530, activant ainsi la protéine. La phosphorylation de ces résidus facilite la déphosphorylation de c-Src par les protéines tyrosine phosphatase<sup>144</sup>. La phosphorylation de S75 par la Cdk5 est directement liée au mécanisme de régulation de c-Src et notamment à la dégradation de c-Src par le protéasome<sup>145</sup>. Le processus de phosphorylation de la S17 par PKA est très bien compris contrairement à son rôle biologique<sup>146</sup>. Sa phosphorylation interfère notamment dans l'interaction électrostatique de c-Src (SH4 et domaine Unique) avec la couche lipidique de la membrane<sup>147</sup> (Figure 58).



**Figure 58 - Effet des différentes phosphorylations au sein du domaine unique**

<sup>141</sup> Lin et al., « Post-Translational Modifications to Regulate Protein Function », in Wiley Encyclopedia of Chemical Biology., John Wiley & Sons, Inc., 2007.

<sup>142</sup> Butterworth, « Book review: Protein phosphorylation. F. Marks (1996). », Cell Biochemistry and Function, vol. 15, no 2, 1 juin 1997

<sup>143</sup> Selenko et al., « In situ observation of protein phosphorylation by high-resolution NMR spectroscopy », Nature structural & molecular biology, vol. 15, no 3, mars 2008.

<sup>144</sup> Stover et al., « Cdc2-mediated modulation of pp60c-src activity. », Journal of Biological Chemistry, vol. 269, no 43, 28 octobre 1994

<sup>145</sup> Pan et al., « Cdk5 targets active Src for ubiquitin-dependent degradation by phosphorylating Src(S75) », Cellular and molecular life sciences: CMLS, vol. 68, no 20, octobre 2011.

<sup>146</sup> Obara et al., « PKA phosphorylation of Src mediates Rap1 activation in NGF and cAMP signaling in PC12 cells », Journal of Cell Science, vol. 117, no 25, 12 janvier 2004.

<sup>147</sup> Walker et al., « Translocation of pp60c-src from the plasma membrane to the cytosol after stimulation by platelet-derived growth factor. », Journal of Biological Chemistry, vol. 268, no 26, 15 septembre 1993

- *Les interactions de l'extrémité N-terminale de c-Src*

- **Avec les lipides**

L'étude RMN de la séquence N-terminale (1-85) appelée **USrc** en présence de bicelles (proportion variable de détergents) a mis en évidence un nouveau point d'interaction avec la membrane (en plus du domaine SH4) : une séquence peptidique appelée UBLR (*Unique Lipid Binding Region*) située dans la région du domaine « unique » (résidus 60 à 67)<sup>71</sup>. Dans le même article<sup>71</sup>, les auteurs ont démontré que le domaine SH3 interagissait avec le motif UBLR. Cette interaction a une influence sur l'ancrage du domaine SH4 de c-Src avec la membrane.

Il a été montré que la phosphorylation de la S17 par PKA a une grande influence sur l'interaction du domaine SH4 avec la membrane et peu d'influence sur l'interaction UBLR-membrane, tandis que la diphosphorylation de S37 et T75 par la GST-CDK5<sup>74</sup>, avaient l'effet inverse. Le fait que ces résidus soient éloignés du site d'interaction avec la membrane suggère que la phosphorylation de ces acides aminés déstabilise l'interaction électrostatique d'USrc avec les lipides<sup>71</sup>.

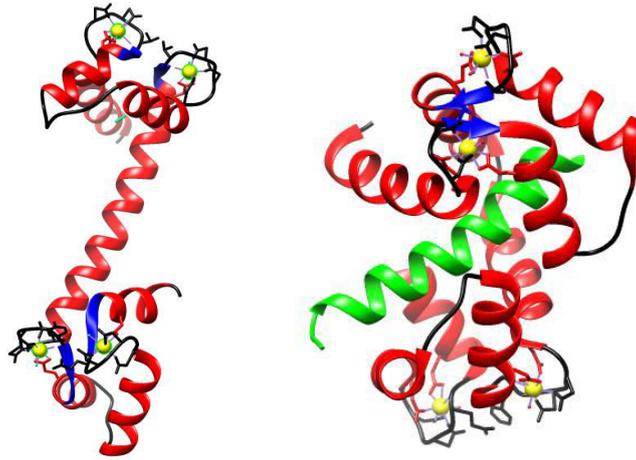
Pérez et coll.<sup>71</sup> ont réalisé différentes mutations sur le domaine unique. Dans la première, les résidus « LFG » (63 à 65) sont remplacés par « AAA » dans la seconde, les résidus « LFGGFN » (63 à 68) sont remplacés par la séquence « AAAEAE ». Le mutant « AAAEAE » possède une charge globale négative, ce qui, dans l'hypothèse où l'interaction avec la membrane serait principalement d'ordre électrostatique, aurait pour effet de supprimer l'interaction du domaine unique avec la membrane. En effet, l'ajout de lipides en présence des mutants, n'induit aucun changement sur le spectre RMN du mutant « AAAEAE » et de faibles changements sur celui du premier mutant « AAA ».

- **Avec une protéine**

La calmoduline (**CaM**) est une protéine capable de lier quatre ions calcium en jaune sur la Figure 59. Généralement, elle intervient comme médiateur de la régulation de calcium chez les végétaux et animaux<sup>148</sup>.

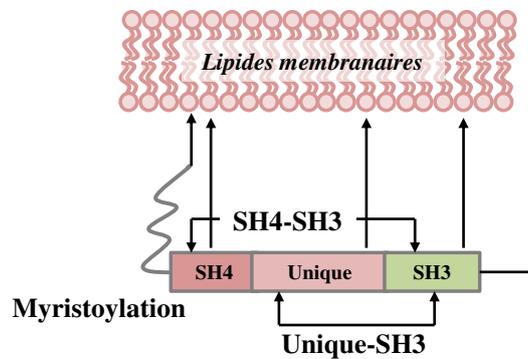
---

<sup>148</sup> Means et Dedman, « Calmodulin—an intracellular calcium receptor », *Nature*, vol. 285, no 5760, 8 mai 1980



**Figure 59 - Structure de la calmoduline activée complexée à quatre ions  $\text{Ca}^{2+}$  (gauche) (PDB : 1CLL) et de la calmoduline activée (4 ions  $\text{Ca}^{2+}$ ) en interaction avec une protéine partenaire (droite) (PDB : 1MXE)  
Les atomes de  $\text{Ca}^{2+}$  sont en jaune et la protéine partenaire en vert**

Elle se lie aux protéines cibles en s'enroulant autour de celles-ci, comme le montre la Figure 59. Les interactions entre certaines IDPs et les lipides sont modulées par la concentration en calcium *via* la Calmoduline<sup>149</sup>. Il a été montré que la CaM interagissait avec le domaine unique de c-Src et que cette interaction diminuait de façon significative la capacité qu'a le domaine unique de se lier à la membrane<sup>71</sup>. Cela suggère que l'interaction entre certaines IDPs, dont c-Src, avec la membrane, pourrait être régulée par la concentration en calcium *via* la Calmoduline<sup>150</sup>.



**Figure 60 – Récapitulatif des interactions intramoléculaire et avec la membrane**

#### 4. Mécanisme cellulaire

La protéine c-Src a un rôle important dans de nombreux mécanismes cellulaires tels que la prolifération, la morphologie, la mobilité cellulaire, etc. La protéine c-Src transfère le groupement

<sup>149</sup> Arbizova et al., « MARCKS, membranes, and calmodulin: kinetics of their interaction », *Biochimica Et Biophysica Acta*, vol. 1376, no 3, 10 novembre 1998.

<sup>150</sup> McLaughlin et Diana Murray, « Plasma membrane phosphoinositide organization by protein electrostatics », *Nature*, vol. 438, no 7068, 1 décembre 2005.

phosphate sur les molécules cibles et régule son activité en modifiant sa structure. Elle permet ou non l'accès à son site actif<sup>120</sup>.

### a. Les différentes conformations

Les points clefs de son fonctionnement sont les réactions de phosphorylation et de déphosphorylation de deux tyrosines. L'une pY530 est reconnue par le domaine SH2, et l'autre, Y419, est localisée dans le domaine SH1 au niveau du domaine de régulation.

La protéine peut exister sous quatre formes :

- c-Src Y530 Y419 : Y530 et Y419 sont déphosphorylées
- c-Src pY530 pY419 : Y530 et Y419 sont phosphorylées
- c-Src pY530 Y419 : seule Y530 est phosphorylée
- c-Src Y530 pY419 : seule Y419 est phosphorylée

Dans la littérature, seules deux de ces conformations sont recensées et ont des structures cristallines connues :

- la **forme inactive** c-Src pY530 Y419, présentant une structure quaternaire compacte, où la tyrosine pY530 est phosphorylée et la Y419 ne l'est pas.
- et la **forme active**, ayant une structure quaternaire étendue, dans laquelle la tyrosine 530 est déphosphorylée et la tyrosine 419 est phosphorylée (Figure 61).

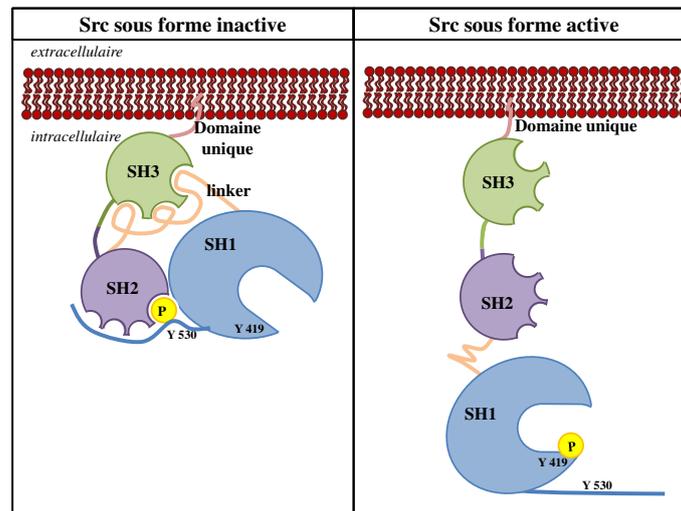


Figure 61 - Conformation de c-Src sous la forme inactive (gauche) et active (droite), d'après Thomas et coll.<sup>126</sup>

Des mutations au niveau des domaines SH2 ou SH3 affectent la stabilité de la conformation inactive<sup>151</sup>. Ceci s'explique par le fait que dans la conformation inactive, l'ensemble des domaines sont en interaction les uns avec les autres. Le domaine SH3 participe à l'augmentation de la stabilité de la

<sup>151</sup> Brown et Cooper, « Regulation, substrates and functions of Src », Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer, vol. 1287, no 2-3, 7 juin 1996.

protéine repliée par son interaction avec plusieurs parties de la protéine, essentiellement avec le « linker » situé entre les domaines SH2 et SH1 (Figure 61). Quant au domaine SH2, il interagit avec la phosphotyrosine pY530 située sur le domaine de régulation, ainsi qu'avec le domaine SH1. Dans la forme inactive, le résidu Asp404 est impliqué dans la coordination d'un ion  $Mg^{2+}$ , une boucle se forme englobant les résidus 413 à 420, emprisonnant ainsi la tyrosine 419, et maintenant la forme inactive stable. Cette boucle appelée boucle hélice A peut être représentée comme une porte permettant ou non l'activation de protéines<sup>120</sup> (Figure 53).

La phosphorylation de la tyrosine Y419 augmente l'activité catalytique et donc l'ouverture de la protéine vers la forme dépliée active (Figure 61). La déphosphorylation de pY530 déstabilise l'interaction entre le domaine SH2 et le domaine SH3 plus aucun domaine n'est en interaction, chaque domaine est libre d'interagir avec des protéines cibles et de transmettre le signal cellulaire.

## b. L'activation de c-Src

La première étape de ce mécanisme est l'activation des récepteurs membranaires (récepteur insuline, récepteur EGF, GAP) par des ligands extracellulaires. La protéine c-Src étant sous sa forme inactive, c'est-à-dire repliée (Figure 61), sera alors activée par le récepteur.

La protéine c-Src est normalement régulée par l'interaction auto-inhibitrice entre le domaine SH2 et le résidu phosphotyrosine **pY530** du côté C-terminal<sup>110, 120</sup>. Dans la plupart des cas, la phosphorylation de ce résidu se fait par l'action de la **Csk** (c-Src tyrosine kinase)<sup>152</sup> (Figure 62).

La déphosphorylation de **Y530**, est réalisée, quant à elle, par des phosphatases telles que la protéine tyrosine phosphate  $\alpha$  (**PTP $\alpha$** )<sup>153</sup>, et a pour effet d'activer la protéine. L'implication de la déphosphorylation dans l'activation de la protéine a été démontrée à plusieurs reprises par différents procédés, *e.g.*, des mutations de Y527, l'équivalent de Y530 pour la c-Src d'origine aviaire<sup>154, 155</sup> ou des suppressions de la région régulatrice C-terminale<sup>156</sup>. Un équilibre entre PTP $\alpha$  et Csk est nécessaire pour que l'activité de la protéine c-Src soit bien régulée, car l'excès de l'un ou le déficit de l'autre entraînerait des effets néfastes sur la cellule.

Deux autres protéines interviennent afin que c-Src puisse être activée : il s'agit de la protéine **FAK**, qui, lorsqu'elle est phosphorylée (pY397) possède une forte affinité pour le domaine SH2<sup>157</sup> et

<sup>152</sup> Cooper et al., « Tyr527 is phosphorylated in pp60c-src: implications for regulation », Science (New York, N.Y.), vol. 231, no 4744, 21 mars 1986.

<sup>153</sup> Zheng et al., « Cell transformation and activation of pp60c-src by overexpression of a protein tyrosine phosphatase », Nature, vol. 359, no 6393, 24 septembre 1992.

<sup>154</sup> Cartwright et al., « Cell transformation by pp60c-src mutated in the carboxy-terminal regulatory domain », Cell, vol. 49, no 1, 10 avril 1987.

<sup>155</sup> Piwnica-Worms et al., « Tyrosine phosphorylation regulates the biochemical and biological properties of pp60c-src », Cell, vol. 49, no 1, 10 avril 1987.

<sup>156</sup> Reynolds et al., « Activation of the oncogenic potential of the avian cellular src protein by specific structural alteration of the carboxy terminus », The EMBO journal, vol. 6, no 8, août 1987.

<sup>157</sup> Schaller et al., « Autophosphorylation of the focal adhesion kinase, pp125FAK, directs SH2-dependent binding of pp60src. », Molecular and Cellular Biology, vol. 14, no 3, 3 janvier 1994

de la protéine **CAS** (*Crk-associated substrate*), qui peut se lier à la fois au domaine SH2 et SH3<sup>158</sup> et transmettre le signal (Figure 62).

Lors d'une anomalie, c'est-à-dire quand il y a surexpression de c-Src, un mécanisme est mis en place, pour activer la dégradation de la protéine par le protéasome. Le processus est classique : grâce à la reconnaissance de l'E3 ubiquitine ligase (CBL)<sup>159</sup>, quatre molécules d'ubiquitine sont greffées sur la protéine à dégrader. Le motif est reconnu par le protéasome, la cible est détruite (Figure 62) et les ubiquitines sont libérées (le processus d'ubiquitylation pour activer la dégradation est décrit en détail dans la sous partie « *Activation et dégradation de IκBα* »). En 2011, Pan et coll. ont montré que la phosphorylation de la serine 75, située au niveau du domaine « unique », facilite cette voie de dégradation<sup>145</sup>. Lorsque c-Src est surexprimée dans les cellules cancéreuses, ce processus n'est plus régulé.

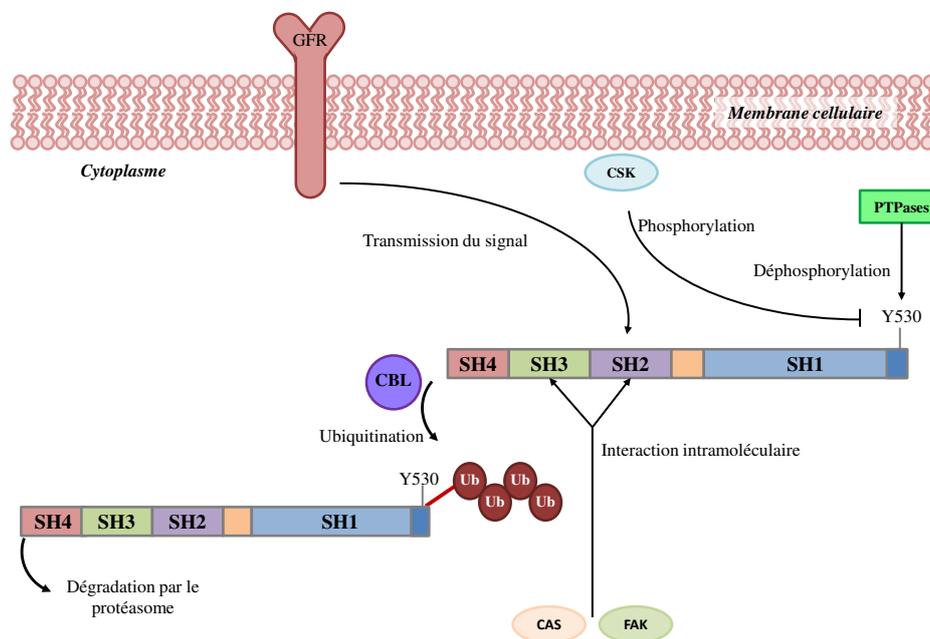


Figure 62 - Régulation de la protéine c-Src d'après Yeatman<sup>94</sup>

CSK (c-Src tyrosine kinase), CBL (E3 ubiquitine ligase), Ub (Ubiquitine), FAK (focal adhesion kinase), CAS (Crk associated substrate)

## 5. Problématique

La protéine c-Src appartient à la famille des protéines tyrosine kinase (PTKs) non récepteurs. Elle joue de nombreux rôles dans la cellule (*e.g.*, prolifération, morphologie). Elle est proto-oncogène car elle est surexprimée dans les cellules cancéreuses. Cette protéine est composée de plusieurs

<sup>158</sup> Burnham et al., « Regulation of c-SRC Activity and Function by the Adapter Protein CAS », *Molecular and Cellular Biology*, vol. 20, no 16, 15 août 2000

<sup>159</sup> Kim et al., « Cbl-c suppresses v-Src-induced transformation through ubiquitin-dependent protein degradation », *Oncogene*, vol. 23, no 9, 4 mars 2004.

domaines (en partant du coté N-terminal vers le coté C-terminal) : le domaine SH4 et le domaine unique en interaction avec la membrane plasmique, les domaines SH3 et SH2 responsables des interactions intra et intermoléculaires, et, pour finir, le domaine SH1, qui est le domaine responsable de l'activité tyrosine kinase, suivi d'un domaine régulateur propre à c-Src (Figure 53). La protéine est bien caractérisée, à l'exception de l'extrémité N-terminale, domaine intrinsèquement désordonné (IDP) de sa hautement flexible. L'étude de ce domaine est importante étant donnée la surexpression de c-Src dans de nombreux cancers.

Au cours de cette thèse, je me suis intéressée à l'étude de l'extrémité N-terminale de c-Src par RMN à l'état liquide, et j'ai proposé de nouvelles sondes techniques d'analyse pour étudier sa structure et sa dynamique moléculaire. Ces résultats seront décrits dans le chapitre 4.

## B. Protéine IκBα

### 1. Introduction

Une autre biomolécule étudiée pendant ma thèse est une protéine issue d'IκBα, protéine impliquée dans les cascades de signalisation cellulaire. Cette protéine est constituée de 24 acides aminés et comprend quatre sites d'interactions caractéristiques d'IκBα, *i.e.*, deux sites d'ubiquitination et deux sites de phosphorylation.

Comme nous l'avons déjà vu précédemment, en RMN, il est possible de suivre la phosphorylation des acides aminés notamment par simple observation des déplacements chimiques de signaux des <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C, ou du <sup>31</sup>P. Jusqu'à récemment, les études sur des systèmes biologiques se faisaient essentiellement *in vitro*. Depuis peu, des études de macromolécules biologiques dans leur environnement naturel, *i.e.*, la cellule se développent. La RMN a permis de montrer que certaines protéines étudiées *in vitro* ou dans les cellules avaient des interactions et des dynamiques différentes<sup>160</sup>. L'étude *in vitro* n'est donc pas toujours représentative du milieu naturel, malgré l'utilisation de tampons adéquats. Il est donc intéressant et essentiel d'étudier le fonctionnement des protéines dans les cellules. Cependant, la présence de nombreux signaux parasites due aux organites cellulaires et à la composition du milieu de culture des cellules, pose problème. De plus, la viscosité du milieu cellulaire étant accrue, la largeur des raies observées en RMN augmente, masquant ainsi de nombreuses informations utiles<sup>161</sup>. Il est donc devenu nécessaire de mettre au point de nouvelles sondes et techniques d'observation adaptées à la RMN dans les cellules ; la première étape étant d'effectuer des essais préliminaires de pénétration de molécules d'intérêt dans la cellule.

La protéine **IκBα** (*inhibiteur de NF-κB*) possède 320 acides aminés. Présente dans le cytoplasme cellulaire, elle est phosphorylée en amont par une autre protéine **IKK** (*IκBα Kinase*), ce qui permet de réguler l'activation d'un facteur de transcription cellulaire **NF-κB** (*nuclear factor-kappa B*). Celui-ci est rencontré dans tous les types cellulaires et est souvent associé à la tumorigénèse. IκBα possède deux sérines phosphorylables et peut exister sous deux formes : diphosphorylée (activation de la voie **NF-κB**) et non phosphorylée (complexé à **NF-κB**). Afin de suivre la phosphorylation d'IκBα, nous nous sommes restreints à étudier une petite partie de la protéine contenant ces sites de phosphorylation. Cette protéine issue d'IκBα comprend les deux sérines phosphorylables par la kinase **IKK**. Nous avons analysé la protéine non phosphorylée et diphosphorylée en présence de lysats cellulaires ou de cellules.

---

<sup>160</sup> Serber et Dötsch, « In-cell NMR spectroscopy », *Biochemistry*, vol. 40, no 48, 4 décembre 2001.

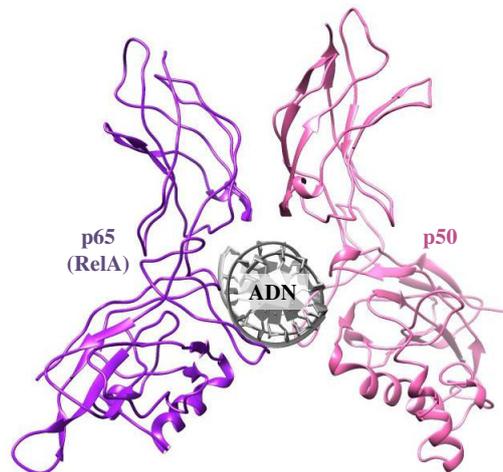
<sup>161</sup> Li et Liu, « Protein dynamics in living cells studied by in-cell NMR spectroscopy », *FEBS Letters*, vol. 587, no 8, 17 avril 2013

## 2. Facteur de transcription NF-κB

### a. Structure de NF-κB

Les cellules eucaryotes ont différentes manières de transmettre le signal cellulaire suite à l'action de stimuli provenant de l'environnement : tabac, stress, obésité, alcool, agents infectieux, irradiation, etc<sup>162</sup>. Ces signaux cellulaires ont pour conséquences de nombreux changements au sein de la cellule, et notamment au niveau des gènes de transcription. Ces derniers sont régulés par des facteurs de transcription, dont NF-κB, découvert par Baltimore et coll. en 1986<sup>163</sup>. Ce facteur de transcription joue un rôle dans plusieurs voies de régulation de différents gènes impliqués dans l'apoptose, la réplication virale, l'inflammation et les réponses immunitaires<sup>164</sup>. NF-κB existe sous plusieurs formes et peut être :

- homodimérique : constituée de deux sous unités p50, protéine impliquée dans l'invasion du réticulum endothélial dans les tissus.
- hétérodimérique : formée dans la grande majorité des cas de p50 et de p65<sup>165</sup> (Figure 63).



**Figure 63 - Structure de NF-κB sous la forme d'hétérodimère p65 / p50 lié à l'ADN<sup>166</sup> (PDB : 1VKX)**

Ces dimères p50 : p50 et p65 : p50 ont des affinités différentes pour l'ADN et vont réguler une variété de gènes<sup>167</sup>. Le complexe hétérodimérique de p65 et p50 a une affinité pour la séquence promotrice 5-GGGACTTCC-3 (Figure 63)<sup>168</sup>.

<sup>162</sup> Prasad et al., « NF-κB and cancer: how intimate is this relationship », *Molecular and Cellular Biochemistry*, vol. 336, no 1-2, mars 2010

<sup>163</sup> Sen et Baltimore, « Multiple nuclear factors interact with the immunoglobulin enhancer sequences », *Cell*, vol. 46, no 5, 29 août 1986.

<sup>164</sup> Baldwin, « THE NF-κB AND IκB PROTEINS: New Discoveries and Insights », *Annual Review of Immunology*, vol. 14, no 1, 1996

<sup>165</sup> Hoesel et Schmid, « The complexity of NF-κB signaling in inflammation and cancer », *Molecular Cancer*, vol. 12, no 1, 2 août 2013.

<sup>166</sup> Ghosh et al., « NF-kappa B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses », *Annual Review of Immunology*, vol. 16, 1998.

<sup>167</sup> Chen et Ghost, « Regulation of DNA binding by Rel/NF-[kappa]B transcription factors: structural views », vol. 18, no 49, 22 novembre 1999.

<sup>168</sup> Chen et al., « Crystal structure of p50/p65 heterodimer of transcription factor NF-kappaB bound to DNA », *Nature*, vol. 391, no 6665, 22 janvier 1998.

## b. Activation de NF- $\kappa$ B

L'activation de NF- $\kappa$ B est déclenchée par une réponse cellulaire face aux stress provoqué par un ou plusieurs stimuli extérieurs tels que les cytokines (TNF : *Tumor Necrosis Factor*), les facteurs de croissance, les UV, les agents pharmaceutiques, etc<sup>169</sup>. Il existe deux voies connues pour l'activation de NF- $\kappa$ B :

- **la voie classique** ou canonique
- **la voie alternative** également appelée non canonique

Seule la voie la plus connue, la voie canonique, sera décrite dans cet ouvrage. Cette voie est employée par les cytokines pro-inflammatoires telles que TNF ou IL1<sup>170</sup> mais aussi par des produits bactériens ou viraux<sup>171</sup>.

NF- $\kappa$ B est ubiquitaire, et généralement localisée dans le cytoplasme lorsqu'elle est sous sa forme inactive. Dans ces conditions, NF- $\kappa$ B est liée à une protéine inhibitrice de son activité<sup>172, 173</sup>, pouvant appartenir à deux catégories :

- **Typiques** : I $\kappa$ B $\alpha$ , I $\kappa$ B $\beta$ , I $\kappa$ B $\epsilon$ , le précurseur p100 et le précurseur p105
- **Atypiques** : Bcl3, I $\kappa$ B $\zeta$

Ces inhibiteurs permettent de maintenir NF- $\kappa$ B dans le cytoplasme en masquant son signal de localisation nucléaire (NLS)<sup>174</sup>.

---

<sup>169</sup> Pomerantz et Baltimore, « Two pathways to NF-kappaB », *Molecular Cell*, vol. 10, no 4, octobre 2002.

<sup>170</sup> Osborn et al., « Tumor necrosis factor alpha and interleukin 1 stimulate the human immunodeficiency virus enhancer by activation of the nuclear factor kappa B », *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 86, no 7, avril 1989.

<sup>171</sup> Sun et Ballard, « Persistent activation of NF-kappaB by the tax transforming protein of HTLV-1: hijacking cellular IkappaB kinases », *Oncogene*, vol. 18, no 49, 22 novembre 1999.

<sup>172</sup> Urban et Baeuerle, « The 65-kD subunit of NF-kappa B is a receptor for I kappa B and a modulator of DNA-binding specificity », *Genes & Development*, vol. 4, no 11, novembre 1990.

<sup>173</sup> Nolan et al., « DNA binding and I kappa B inhibition of the cloned p65 subunit of NF-kappa B, a rel-related polypeptide », *Cell*, vol. 64, no 5, 8 mars 1991.

<sup>174</sup> Beg et al., « I kappa B interacts with the nuclear localization sequences of the subunits of NF-kappa B: a mechanism for cytoplasmic retention », *Genes & Development*, vol. 6, no 10, octobre 1992.

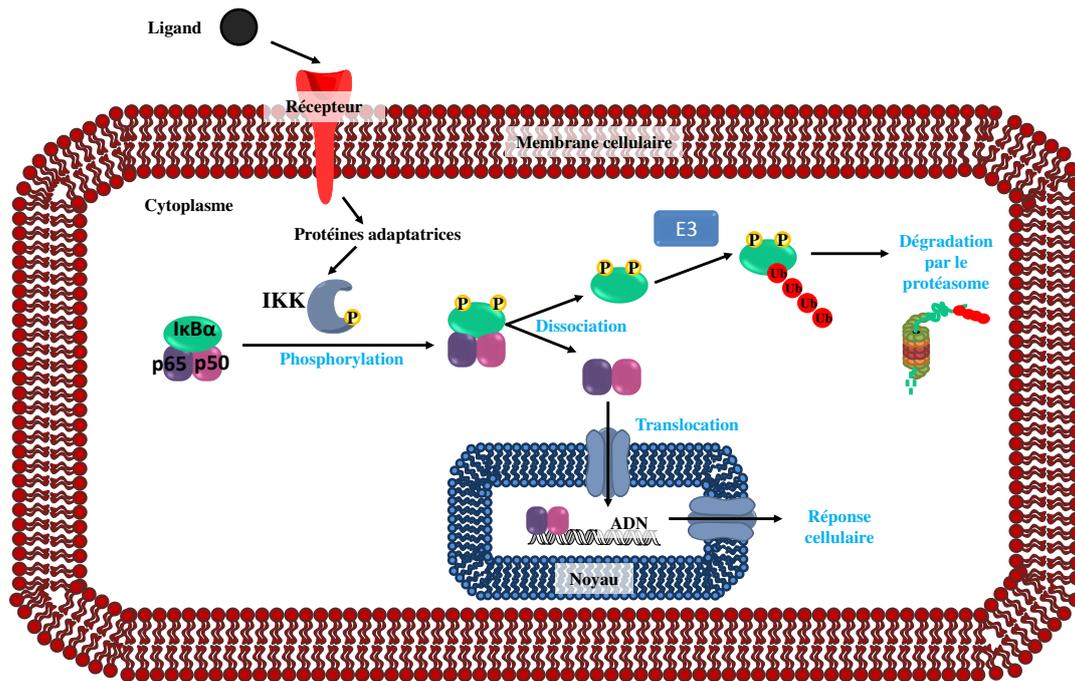


Figure 64 - Mécanisme d'activation de NF-κB<sup>175</sup>

La première étape dans l'activation de NF-κB consiste en la reconnaissance d'un ligand par la partie extracellulaire d'un récepteur. Celui-ci, va par la suite, interagir avec d'autres protéines intracellulaires appelées protéines adaptatrices. Par une cascade de réactions de phosphorylation, plusieurs protéines vont être activées. La première, la kinase IKK va phosphoryler IκBα complexée au facteur de transcription NF-κB. Ce mécanisme de phosphorylation sera décrit dans le paragraphe suivant consacré à IκBα. Le complexe IκBα / NF-κB (formé de p50 : p65 Figure 64) va alors se dissocier, IκBα sera dégradée par protéolyse<sup>176</sup> et NF-κB sera transporté jusqu'au noyau. Dans le nucléoplasme, NF-κB, sous forme d'hétérodimère (p50 : p65), se lie à l'ADN via une séquence promotrice (5-GGGACTTTCC-3), régulant ainsi la transcription de gènes impliqués dans les réponses immunitaires et inflammatoires qui en découlent<sup>177</sup> (Figure 64). La cristallisation de la sous unité p50 a montré que celle-ci interagissait avec l'ADN par son extrémité N-terminale au niveau de la région RHD alors que la dimérisation se produit grâce à son extrémité C-terminale<sup>178</sup>.

Le retour de NF-κB inactif s'effectue sous le contrôle du promoteur IκBα et est réalisé généralement par son association avec une protéine IκBβ<sup>179</sup>. IκBα et IκBβ sont interchangeable et ceci peut s'expliquer par le fait que leurs structures respectives sont proches.

<sup>175</sup> Gilmore, « Introduction to NF-κB: players, pathways, perspectives », *Oncogene*, vol. 25, no 51, 2006

<sup>176</sup> Henkel et al., « Rapid proteolysis of I kappa B-alpha is necessary for activation of transcription factor NF-kappa B », *Nature*, vol. 365, no 6442, 9 septembre 1993.

<sup>177</sup> Dixit et Mak, « NF-κB Signaling », *Cell*, vol. 111, no 5, 27 novembre 2002.

<sup>178</sup> Müller et al., « Structure of the NF-kappa B p50 homodimer bound to DNA », *Nature*, vol. 373, no 6512, 26 janvier 1995.

<sup>179</sup> Cheng et al., « Functional redundancy of the nuclear factor kappa B inhibitors I kappa B alpha and I kappa B beta », *The Journal of Experimental Medicine*, vol. 188, no 6, 21 septembre 1998.

### c. Gènes cibles

Comme il a été expliqué précédemment dans la sous partie « *structure de NF-κB* », NF-κB, du fait des différentes formes sous lesquelles il peut exister, est impliquée dans de nombreuses pathologies : cancers, maladies neurodégénératives, asthme, etc<sup>180</sup>. Grâce à ses multiples facettes, NF-κB a une multitude de gènes cibles :

- Les gènes impliqués dans les réponses inflammatoires : TNFα IL6 et IL8<sup>181</sup>
- Les gènes codant les protéines anti-apoptotiques<sup>182</sup>
- Les gènes contrôlant l'expression des gènes régulateurs des cycles cellulaires<sup>183</sup>
- Les gènes de l'invasion pendant l'angiogénèse, la métastase
- Les gènes de la prolifération

### d. NF-κB et les cancers

NF-κB est un facteur de transcription qui a de nombreux rôles de régulation dans diverses cellules saines. Mais lors d'une activation excessive par des facteurs environnementaux (tabac, irradiations, médicaments, etc) nuisant à la survie des cellules saines, NF-κB joue un rôle important dans la prolifération et l'invasion de cellules cancéreuses générées<sup>162</sup>. NF-κB est ainsi retrouvée dans une multitude de cancers, comme l'ont montré Prasaad et coll.<sup>162</sup> en 2010 (Figure 65).

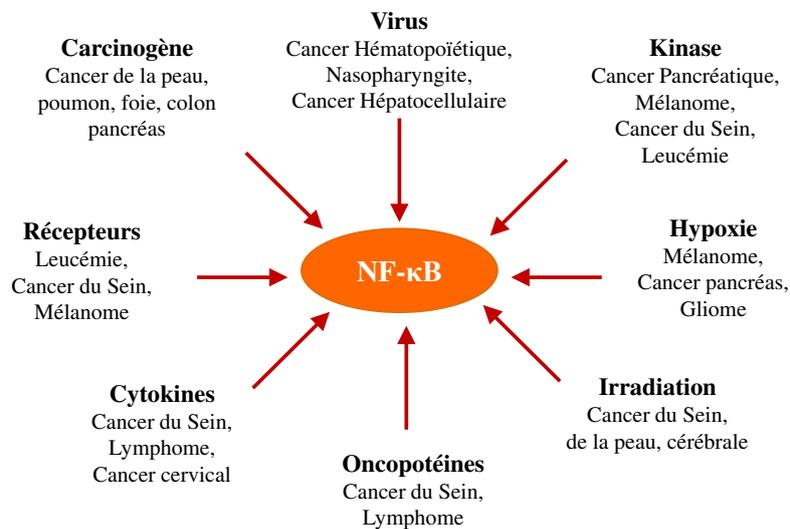


Figure 65 - Présence de NF-κB dans plusieurs cancers provoqués par diverses sources<sup>162</sup>

NF-κB est une cible intéressante dans la lutte contre les cancers.

<sup>180</sup> Courtois et Gilmore, « Mutations in the NF-κB signaling pathway: implications for human disease », *Oncogene*, vol. 25, no 51, 30 octobre 2006.

<sup>181</sup> Kang et al., « Human placenta promotes IL-8 expression through activation of JNK/SAPK and transcription factors NF-kappaB and AP-1 in PMA-differentiated THP-1 cells », *International Immunopharmacology*, vol. 7, no 11, novembre 2007.

<sup>182</sup> Iwanaga et al., « Activation of the cyclin D2 and cdk6 genes through NF-kappaB is critical for cell-cycle progression induced by HTLV-I Tax », *Oncogene*, vol. 27, no 42, 18 septembre 2008.

<sup>183</sup> Krikos et al., « Transcriptional activation of the tumor necrosis factor alpha-inducible zinc finger protein, A20, is mediated by kappa B elements », *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 267, no 25, 5 septembre 1992.

### 3. Les protéines inhibitrices IκBs

#### a. Protéines inhibitrices

Dans le cadre de la régulation de NF-κB, il existe plusieurs protéines inhibitrices qui peuvent interagir avec les dimères de ce facteur de transcription :

- **IκBα** se lie à l'hétérodimère p65 / p50 <sup>184</sup>
- **IκBβ** avec le p65 / p50 <sup>185</sup>
- **IκBε** avec l'homodimère p65, et l'hétérodimère p65 / cRel (autre sous-unité de NF-κB)
- **Bcl3** avec le dimère p50, p52 KBe KBNS (voie non canonique)

Les IκB masquent le site de localisation nucléaire (NLS) des sous unités p50 et p65 en s'associant avec le facteur de transcription NF-κB <sup>174</sup>. Les complexes ainsi formés permettent de stabiliser NF-κB dans le cytoplasme sous sa forme inactive. Bien que chaque IκB ait une affinité pour l'un des dimères, dans la voie classique, c'est en combinaison des trois IκBs qui permet de réguler le facteur NF-κB (hétérodimère p65 : p50) <sup>186</sup>. Le temps de dissociation et de dégradation par le protéasome permet de distinguer (en plus de leur structure) les trois IκBs <sup>187</sup> ; par exemple, IκBβ se dégrade beaucoup plus lentement qu'IκBα dans la voie canonique <sup>188</sup>. Par ailleurs, IκBβ, semble être le seul de la famille des IκBs à pouvoir se localiser aussi bien dans le cytoplasme que dans le noyau. Il est ainsi capable de s'associer à l'hétérodimère NF-κB lié à l'ADN <sup>189</sup> et de réguler son activité. Le mécanisme de réaction de NF-κB est relativement bien compris, contrairement à celui de son inhibiteur IκBα qui reste encore très peu connu. Nous allons maintenant nous intéresser à IκBα.

#### b. Structure de IκBα

Les IκBs ont une structure similaire : répétition du motif ankyrine, site de phosphorylation, d'ubiquitinylation et pour certaines, une séquence riche en résidus proline (P), glutamate (E), sérine (S), thréonine (T) (Figure 66). Cette dernière appelée **PEST**, serait liée au phénomène de dégradation d'IκBs <sup>190, 191</sup> (Figure 66). Le domaine ankyrine contient 33 acides aminés qui ont été identifiés pour la

<sup>184</sup> Karin et Ben-Neriah, « Phosphorylation Meets Ubiquitination: The Control of NF-κB Activity », *Annual Review of Immunology*, vol. 18, no 1, 2000

<sup>185</sup> Weil et al., « Control of NF-kappa B activity by the I kappa B beta inhibitor », *Immunobiology*, vol. 198, no 1-3, décembre 1997.

<sup>186</sup> Tergaonkar et al., « Distinct roles of IkappaB proteins in regulating constitutive NF-kappaB activity », *Nature Cell Biology*, vol. 7, no 9, septembre 2005.

<sup>187</sup> Hoffmann et al., « The IkappaB-NF-kappaB signaling module: temporal control and selective gene activation », *Science (New York, N.Y.)*, vol. 298, no 5596, 8 novembre 2002.

<sup>188</sup> Wu et Ghosh, « Differential phosphorylation of the signal-responsive domain of I kappa B alpha and I kappa B beta by I kappa B kinases », *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 278, no 34, 22 août 2003.

<sup>189</sup> Suyang et al., « Role of unphosphorylated, newly synthesized I kappa B beta in persistent activation of NF-kappa B. », *Molecular and Cellular Biology*, vol. 16, no 10, 10 janvier 1996

<sup>190</sup> Malek et al., « IκBα Functions through Direct Contacts with the Nuclear Localization Signals and the DNA Binding Sequences of NF-κB », *Journal of Biological Chemistry*, vol. 273, no 39, 25 septembre 1998

première fois dans les protéines ankyrines des érythrocytes humains<sup>192</sup>. Ce motif est retrouvé dans une variété de protéines ayant diverses fonctions<sup>193</sup>. Chaque motif est formé de deux hélices  $\alpha$ , puis d'une boucle étroite et séparé du suivant par une distance  $d = 11 \text{ \AA}$ .

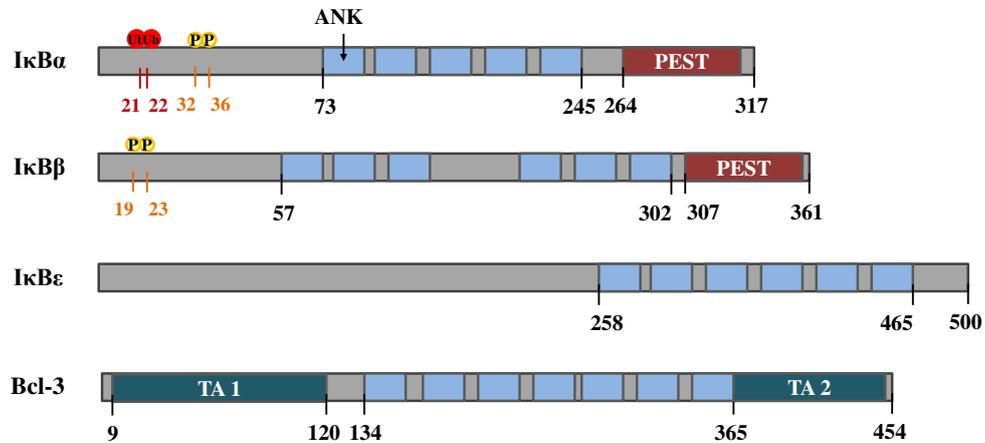


Figure 66 - Structure des protéines inhibitrices de NF- $\kappa$ B

Mise en évidence des domaines ankyrine (bleu), du domaine PEST (rouge), des sites de phosphorylation (P) et d'ubiquitylation (Ub) et du domaine de l'Activation de la Transcription TA1 et 2 pour Bcl3

La protéine I $\kappa$ B $\alpha$  possède environ 300 acides aminés et est composée de nombreuses hélices  $\alpha$  et de deux feuillets  $\beta$  (Figure 67). Elle contient 5 motifs ankyrine à partir de son 71<sup>e</sup> acide aminé et jusqu'au 245<sup>e</sup>.

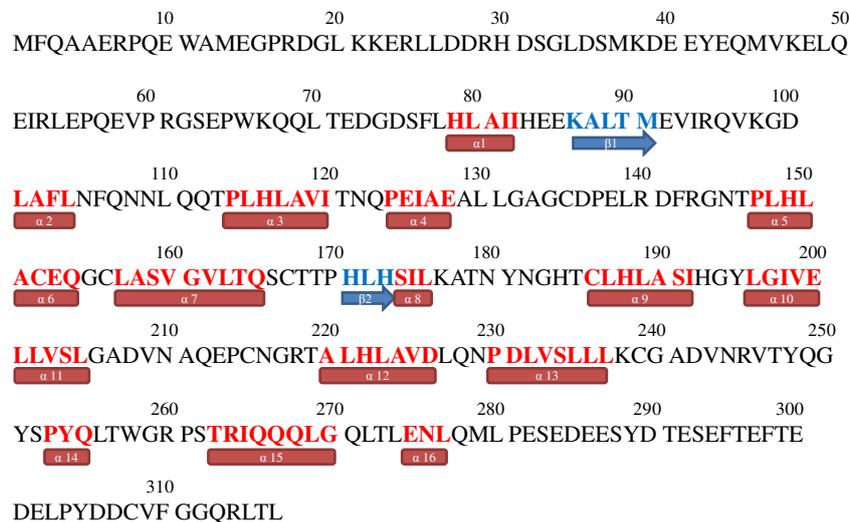


Figure 67 - Séquence peptidique d'I $\kappa$ B $\alpha$  avec la structure secondaire (PDB : 1NFI)

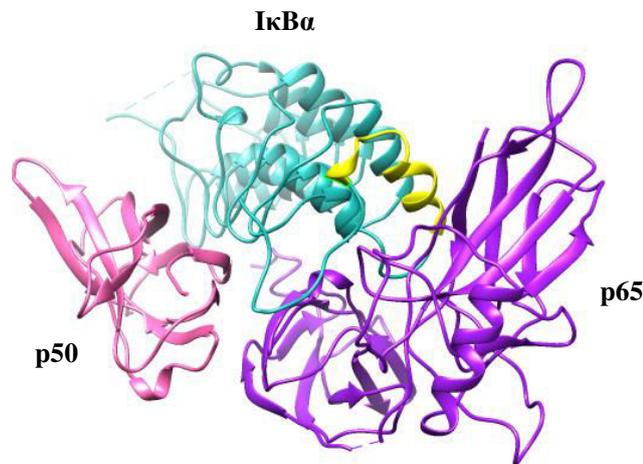
La région entre les acides aminés 263 et 277 est riche en glutamates et leucines. Il a été montré que cette région a une importance dans la dégradation et l'inhibition du dimère p65 de NF- $\kappa$ B (Figure

<sup>191</sup> Mathes et al., « NF-kappaB dictates the degradation pathway of IkappaBalpha », The EMBO journal, vol. 27, no 9, 7 mai 2008.

<sup>192</sup> Bennett et Stenbuck, « Identification and partial purification of ankyrin, the high affinity membrane attachment site for human erythrocyte spectrin. », Journal of Biological Chemistry, vol. 254, no 7, 4 octobre 1979

<sup>193</sup> Michaely et Bennett, « The ANK repeat: a ubiquitous motif involved in macromolecular recognition », Trends in Cell Biology, vol. 2, no 5, mai 1992.

68). Le domaine PEST permet à la protéine de former un complexe stable avec NF- $\kappa$ B et d'avoir un « turnover » rapide. La kinase casein II est capable de phosphoryler des serines et des thréonines présents dans cette région d'I $\kappa$ B $\alpha$ .



**Figure 68 - I $\kappa$ B $\alpha$  complexé à NF- $\kappa$ B (PDB : 1IKN)**  
Mise en évidence des régions riches en glutamates et leucines (jaune)

### c. I $\kappa$ B $\alpha$ kinase : IKK

IKK est un complexe multi-protéique (900 kDa) composé de deux sous-unités catalytiques, IKK $\alpha$  et IKK $\beta$  et d'une sous-unité régulatrice, NEMO (*NF- $\kappa$ B Essential Modulator*) / IKK $\gamma$ <sup>194</sup>. IKK $\alpha$  et IKK $\beta$  sont respectivement des sous-unités de 85 et 87 kDa. Toutes deux sont composées à l'extrémité N-terminale d'un domaine kinase et d'un motif hélice boucle hélice (HLH) (Figure 69, Figure 70). Les deux sous unités catalytiques dimérisent par leur domaine leucine zipper (Lz), ce domaine étant nécessaire pour l'activité kinase<sup>195</sup>. *In vivo*, IKK $\alpha$  et IKK $\beta$  sont préférentiellement sous forme d'hétérodimères, et *in vitro*, il a été montré que cet hétérodimère a une meilleure activité catalytique que les homodimères respectifs<sup>196</sup>.

<sup>194</sup> Hacker et Karin, « Regulation and Function of IKK and IKK-Related Kinases », *Science Signaling*, vol. 2006, no 357, 17 octobre 2006.

<sup>195</sup> Zandi et al., « The I $\kappa$ B Kinase Complex (IKK) Contains Two Kinase Subunits, IKK $\alpha$  and IKK $\beta$ , Necessary for I $\kappa$ B Phosphorylation and NF- $\kappa$ B Activation », *Cell*, vol. 91, no 2, 17 octobre 1997

<sup>196</sup> Huynh et al., « Characterization of the recombinant IKK1/IKK2 heterodimer. Mechanisms regulating kinase activity », *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 275, no 34, 25 août 2000.

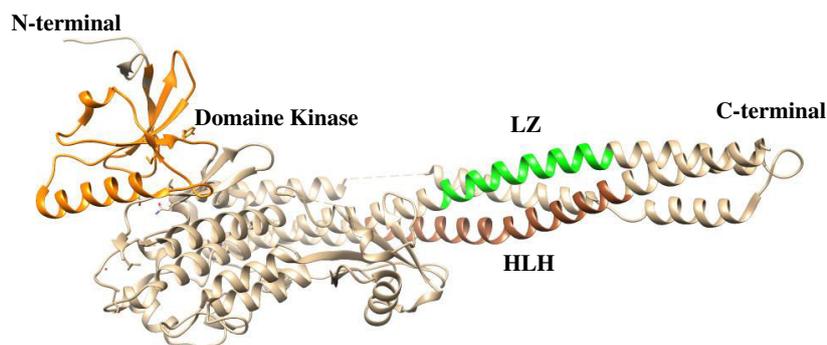


Figure 69 - Structure de IKK $\beta$  (PDB : 4KIK)

Mise en évidence du domaine kinase en orange, du domaine leucine « zipper » en vert et le domaine « hélice loop hélice » en marron.

Du côté C-terminal, IKK $\alpha$  et IKK $\beta$  sont caractérisées par un domaine NBD (*NEMO Binding Domain*)<sup>197, 198</sup> (Figure 69), qui tire son nom de l'interaction entre NEMO, protéine de 48 kDa, et IKK $\alpha$  ou IKK $\beta$  *via* six acides aminés « Leu-Asp-Trp-Ser-Trp-Leu » localisés du côté C-terminal.

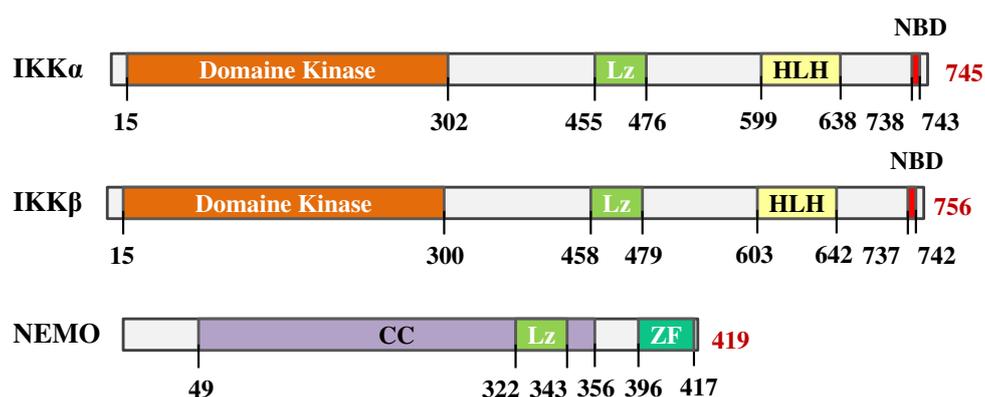


Figure 70 - Structure primaire de la famille d'IKK : IKK $\alpha$ , IKK $\beta$  et NEMO

Dans la voie classique d'activation de NF- $\kappa$ B, les deux sous-unités IKK $\alpha$  et IKK $\beta$  sont nécessaires pour la phosphorylation des deux sérines d'I $\kappa$ B $\alpha$ <sup>199</sup>. IKK $\beta$  et NEMO sont nécessaires pour la rapidité de réponse de NF- $\kappa$ B dans les signaux pro-inflammatoires. NEMO est la sous unité essentielle pour l'activité d'IKK, car en son absence il n'y a pas d'activation de NF- $\kappa$ B<sup>200</sup>. Par des expériences de mutations, McKenzie et coll.<sup>201</sup> ont mis en évidence l'importance des différents domaines, Lz, HLH, NBD, présents dans les sous unités d'IKK (Figure 70). Leur absence accroît l'expression de l'activité chez IKK $\alpha$  et inhibe l'activité d'IKK $\beta$ <sup>201</sup>.

<sup>197</sup> May et al., « Selective inhibition of NF-kappaB activation by a peptide that blocks the interaction of NEMO with the IkappaB kinase complex », Science (New York, N.Y.), vol. 289, no 5484, 1 septembre 2000.

<sup>198</sup> May et al., « Characterization of the Ikappa B-kinase NEMO binding domain », The Journal of Biological Chemistry, vol. 277, no 48, 29 novembre 2002.

<sup>199</sup> Woronicz et al., « IkappaB kinase-beta: NF-kappaB activation and complex formation with IkappaB kinase-alpha and NIK », Science (New York, N.Y.), vol. 278, no 5339, 31 octobre 1997.

<sup>200</sup> Rothwarf et al., « IKK-gamma is an essential regulatory subunit of the IkappaB kinase complex », Nature, vol. 395, no 6699, 17 septembre 1998.

<sup>201</sup> McKenzie et al., « Functional isoforms of IkappaB kinase alpha (IKKalpha) lacking leucine zipper and helix-loop-helix domains reveal that IKKalpha and IKKbeta have different activation requirements », Molecular and Cellular Biology, vol. 20, no 8, avril 2000.

Lors de l'activation de NF- $\kappa$ B, le complexe IKK est phosphorylé par la protéine TAK1<sup>202</sup>. Ces phosphorylations sont nécessaires pour activer le complexe IKK. Chaque sous-unité est phosphorylée au niveau de deux sérines : S176 et S180 pour IKK $\alpha$ , et S177 et S181 pour IKK $\beta$ . Une fois activée, IKK $\beta$  s'autophosphoryle au niveau de la sérine à l'extrémité C-terminale<sup>203</sup>. Le complexe IKK activé phosphoryle à son tour les I $\kappa$ Bs.

#### d. Activation et dégradation de I $\kappa$ B $\alpha$

Au cours de l'activation de NF- $\kappa$ B, le complexe IKK va pouvoir phosphoryler les I $\kappa$ Bs. Plus précisément, les sous-unités IKK $\alpha$  et IKK $\beta$  phosphorylent respectivement les sérines 32 et 36 d'I $\kappa$ B $\alpha$ . IKK $\alpha$  est moins efficace que la sous unité IKK $\beta$ <sup>204</sup>. Lorsqu'I $\kappa$ B $\alpha$  est diphosphorylée, la protéine se dissocie de NF- $\kappa$ B. I $\kappa$ B $\alpha$  étant libre, l'ubiquitine ligase E3 peut l'ubiquitinyler au niveau de deux lysines (K21 et K22)<sup>205</sup>. Celles-ci seront reconnues par le protéasome 26S<sup>184</sup> et la protéine I $\kappa$ B $\alpha$  sera dégradée.

L'ubiquitylation de toutes les protéines (dont I $\kappa$ B $\alpha$ ) se produit en trois étapes :

- L'ubiquitine est activée par l'enzyme d'activation d'ubiquitylation E1,
- L'ubiquitine activée est transférée grâce à la protéine de transport E2.
- L'ubiquitine est reconnue par l'ubiquitine protéine ligase E3, qui catalyse la formation de la liaison covalente de l'ubiquitine à la protéine cible.

Il faut plusieurs ubiquitylations, au minimum quatre, pour que le protéasome 26S (700 kDa) reconnaisse le motif et dégrade la protéine cible en recyclant l'ubiquitine<sup>206</sup> (Figure 71).

---

<sup>202</sup> Israël, « The IKK complex: an integrator of all signals that activate NF- $\kappa$ B? », Trends in Cell Biology, vol. 10, no 4, avril 2000

<sup>203</sup> Delhase et al., « Positive and negative regulation of I $\kappa$ B kinase activity through IKK $\beta$  subunit phosphorylation », Science (New York, N.Y.), vol. 284, no 5412, 9 avril 1999.

<sup>204</sup> Hayden et Ghosh, « Signaling to NF- $\kappa$ B », Genes & Development, vol. 18, no 18, 15 septembre 2004

<sup>205</sup> Chen et al., « Signal-induced site-specific phosphorylation targets I $\kappa$ B $\alpha$  to the ubiquitin-proteasome pathway. », Genes & Development, vol. 9, no 13, 7 janvier 1995

<sup>206</sup> Ciechanover, « The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway », Cell, vol. 79, no 1, 7 octobre 1994.



# **Chapitre III**



### III. Etude de l'extrémité N-terminale de c-Src

---

#### A. Production de l'extrémité N-terminale la protéine c-Src

##### 1. Choix de la souche bactérienne

Le choix de la souche bactérienne est important car il dépend de la nature de la protéine à produire. La souche bactérienne la plus utilisée est *Escherichia coli* (E. Coli), bactérie commensale du système digestif de l'homme. Cette bactérie présente de nombreux avantages : sa génétique est bien connue, elle est très facile à cultiver et elle induit une forte expression de protéines recombinantes, ce qui fait d'elle une souche de choix par rapport aux autres bactéries (*Bacillus*, *Streptomyces*). Un des inconvénients de l'expression en bactérie est que les modifications post-traductionnelles telles que la glycosylation, phosphorylation, ne sont pas effectuées. Si l'on souhaite avoir ces modifications il est préférable de choisir des cellules plus complexes, telles que les levures.

Afin de produire une protéine recombinante, on utilise un plasmide qui joue le rôle de vecteur d'expression sur lequel est inséré le gène codant pour la protéine d'intérêt. Pour insérer l'ADN, il existe des sites de coupures qui sont reconnus par des enzymes de restriction, et la ligature entre le plasmide et l'insert d'ADN est réalisé par des ligases. Les enzymes de restriction sont d'origine bactérienne, elles reconnaissent des séquences spécifiques de l'ADN, 4 à 8 paires de bases, et clivent l'ADN sur les 2 brins au niveau de ces sites par ruptures de liaisons phosphodiester.

Lorsque la protéine contient un nombre important de codons rares de E. Coli, la surexpression de la protéine recombinante est fortement diminuée. Il faut alors utiliser une souche spécifique capable d'exprimer les ARN de transfert correspondant à ces codons rares<sup>209, 210</sup>.

Il existe 5 acides aminés possédant des codons rares, l'arginine, l'isoleucine, la leucine, la proline et la glycine. Ces codons rares sont les suivants :

**Arginine – AGG / AGA et CGA**

**Isoleucine - ATA**

**Leucine - CTA**

**Proline - CCC**

**Glycine – GGA**

La séquence peptidique de l'extrémité N-terminale de c-Src possède 85 acides aminés (Figure 73).

---

<sup>209</sup> Kane, « Effects of rare codon clusters on high-level expression of heterologous proteins in *Escherichia coli* », *Current Opinion in Biotechnology*, vol. 6, no 5, octobre 1995.

<sup>210</sup> Kurland et Gallant, « Errors of heterologous protein expression », *Current Opinion in Biotechnology*, vol. 7, no 5, octobre 1996.



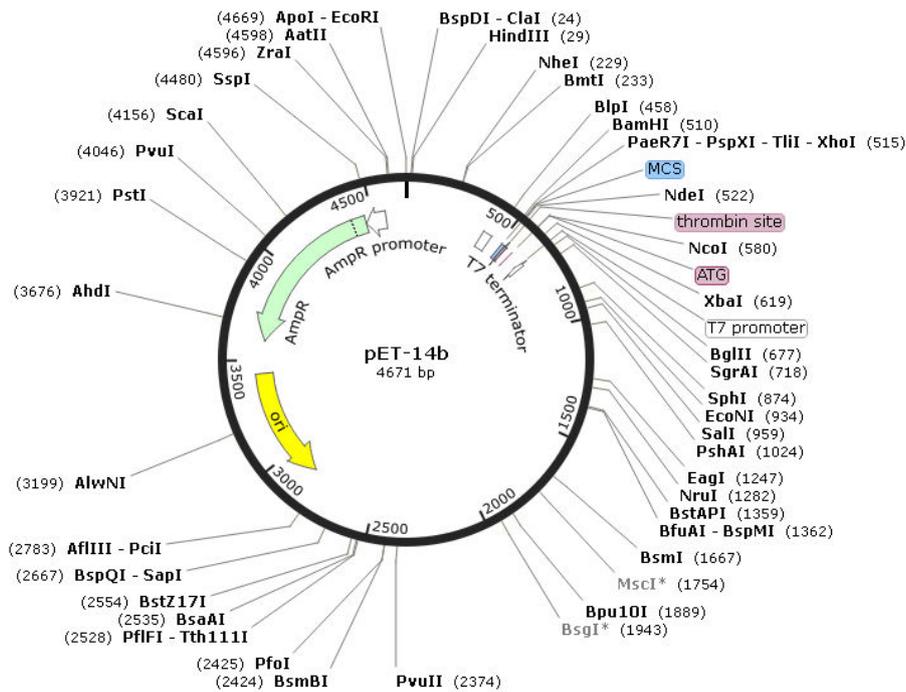


Figure 75 - Plasmide pET-14b (Novagen)<sup>213</sup>

Ce plasmide contient la séquence codant pour l'ampicilline (« AmpR » en vert) (Figure 75). Ce plasmide, une fois ingéré par la bactérie Rosetta<sup>TM</sup>, permet à celle-ci d'être résistante à l'ampicilline. Au site N-terminal de ce vecteur se trouve une séquence His-Tag (en violet sur la Figure 76) qui est suivie d'un site de clivage de la thrombine (Figure 76).

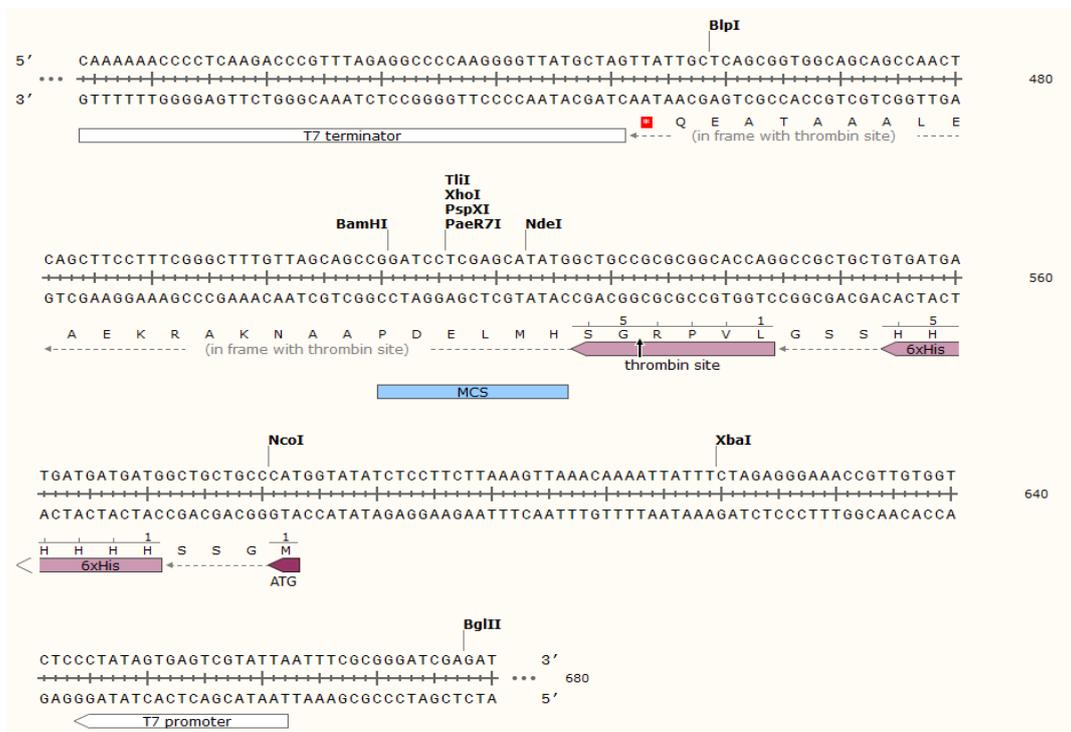


Figure 76 - Région du vecteur d'expression pET-14b (Novagen)<sup>213</sup>

<sup>213</sup> [https://www.snapgene.com/resources/plasmid\\_files/](https://www.snapgene.com/resources/plasmid_files/)

### 3. L'extrémité N-terminale de la protéine c-Src - USrc

L'extrémité N-terminale de la protéine c-Src (appelée USrc par simplification dans ce chapitre) regroupe le domaine SH4 et le domaine unique (résidus 1-85). USrc est clonée à partir de l'ADN humain et elle est exprimée par la souche Rosetta de E. Coli. La protéine native est myristoylée sur le second résidu (glycine) de son extrémité N-terminale. Dans notre cas, le plasmide qui nous a été fourni correspond à USrc avec une mutation sur le second acide aminé, glycine en alanine. Cette mutation permet à la protéine d'être plus stable dans le milieu d'analyse (Figure 77).

```
1           11           21           31           41           51
MASNKSKPKD ASQRRRSLE P AENVHGAGGG AFPASQTPSK PASADGHRGP SAAFAPAAAE

61           71           81           91
PKLFGGFNSS DTVTSPQRAG PLAGG SAWSH PQFEK
```

Figure 77 - Séquence peptidique d'USrc

Les résidus en italique ne sont pas présents dans la protéine native et correspondent au Strep-Tag ajouté afin de pouvoir purifier la protéine.

### 4. Synthèse protéique de USrc

Le protocole utilisé est celui communiqué par nos collaborateurs de l'IRB de Barcelone, l'équipe du Pr. Miquel Pons<sup>74</sup>. Le protocole détaillé est en Annexe (A).

#### a. Expression de la protéine USrc marquée en <sup>15</sup>N

La transformation des bactéries est réalisée classiquement en introduisant le plasmide recombinant par un choc thermique des bactéries Rosetta compétentes. Les bactéries sont gardées à 37°C pendant toute la nuit afin qu'elles prolifèrent en présence des deux antibiotiques, l'ampicilline et le chloramphénicol.

L'expression de la protéine marquée est réalisée à partir de 100 ml de pré-culture séparée en 4, puis centrifugés (3 000 rpm, 10 min) afin d'obtenir un culot de bactéries qui est ensuite dilué dans 4 erlenmeyers contenant chacun 500 ml de milieu nutritif M9 marqué en <sup>15</sup>N. Le milieu a été préalablement préparé avec du Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, NaCl et <sup>15</sup>NH<sub>4</sub>Cl dans de l'eau ultra pure et stérilisé à l'autoclave. Lors de la dissolution du culot dans les 500 ml, des additifs nutritifs sont introduits : MgSO<sub>4</sub>, CaCl<sub>2</sub>, thiamine, glucose, et des antibiotiques ampicillines et chloramphénicol afin de privilégier les bactéries contenant le plasmide d'intérêt.

On laisse ensuite les bactéries se multiplier à 37°C sous agitation, la DO est mesurée toute les heures ( $\lambda = 595$  nm). La croissance bactérienne est arrêtée lorsque la DO correspondante est comprise entre 0.5 et 0.8 (Figure 78). En moyenne entre 4 et 5 h après le début de la culture, la DO est atteinte, on

baisse alors la température à 22°C et on ajoute 1 mM de IPTG qui va induire l'expression de la protéine d'intérêt. Pour obtenir un bon rendement d'expression, c'est-à-dire un maximum de bactéries viables, on les laisse sous agitation pendant toute la nuit à 22°C.

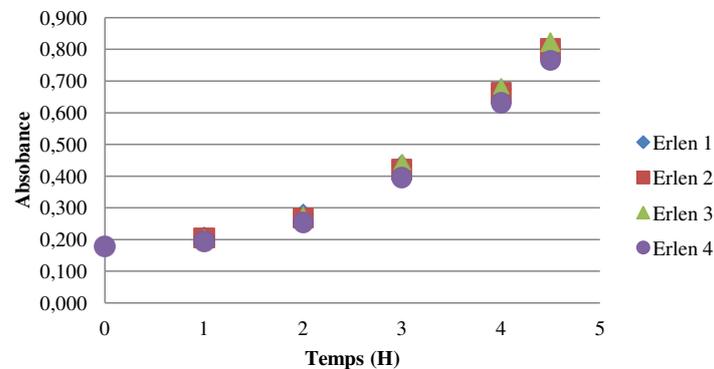


Figure 78 - Evolution de la densité optique des Rosetta en fonction du temps

Le lendemain on centrifuge le milieu (6 000 rpm, 10 min) afin d'obtenir un culot de bactéries contenant la protéine exprimée. On peut réaliser la lyse des bactéries afin de récupérer leur contenu.

### b. Purification de la protéine c-Src

Le culot obtenu est mis en suspension dans le tampon de lyse Tris HCl pH 7.5 dans lequel on ajoute le lysosyme ainsi que du PMSF et on laisse agir pendant 15 min. Le lysosyme facilite la lyse de la paroi bactérienne et le PMSF est un inhibiteur de protéases. La lyse des bactéries s'effectue à l'aide d'un sonicateur (6 impulsions de 30 s espacées de 30 s chacune). Pour éviter la surchauffe des bactéries, le récipient est maintenu dans la glace. Après la sonication, on ajoute de l'ADNase I, qui est une endonucléase coupant les simples et doubles brins d'ADN et on la laisse agir 20 min. On centrifuge à nouveau (12 000 rpm, 45 min) afin d'extraire la protéine, qui se trouve dans le surnageant. Le culot bactérien est conservé à 4°C pour une analyse ultérieure.

La protéine USrc est purifiée à l'aide d'une colonne de résine de sepharose Strep-Tactin® qui la sélectionnera par affinité avec le Strep-Tag. La résine de sepharose Strep-Tactin® est rincée avec le tampon de lyse (L), puis on la centrifuge. On y introduit ensuite le surnageant contenant la protéine à purifier. On laisse le mélange sous agitation à 4°C pendant 16 heures maximum.

L'ensemble (résine et protéine) est ensuite introduit sur une colonne à faible débit, on récupère une première fraction (FT), qui ne contient pas notre protéine. Comme toute colonne chromatographique, la résine ne doit pas se trouver à sec afin de ne pas engendrer de bulles d'air. On réalise dans un premier temps un rinçage de la colonne à l'aide d'un tampon de rinçage Tris-HCl pH 8 (R), ce qui permet d'éliminer toutes les traces de résidus non souhaités. On réalise régulièrement un test de Bradford afin de s'assurer que toutes les protéines non souhaités sont éluées. Il s'agit d'un test colorimétrique basé sur un changement de couleur : marron en absence de protéine et bleu foncé

lorsque la concentration en protéines est élevée. Ce changement de couleur est dû au bleu de Comassie (réactif) qui se lie par complexation aux résidus basiques et hydrophobes présents dans la séquence protéique. La lecture de l'absorbance est réalisée à 595 nm.

On conserve chaque élution afin de les observer par électrophorèse (SDS gel). Après 5 à 6 rinçages, si le test de Bradford est négatif, on élue notre protéine par ajout de 2 ml d'un tampon d'élution contenant de la d-desthiobiotine (2.5 mM), qui a une plus grande affinité pour la résine Strep-Tactin® et va ainsi libérer notre protéine (Figure 79).

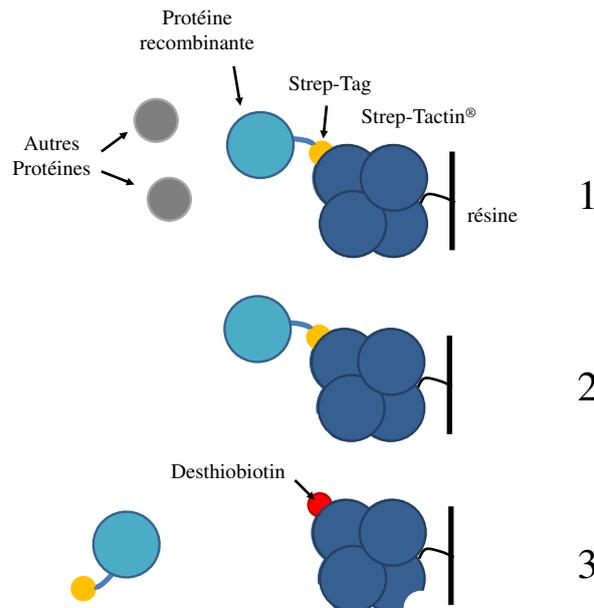


Figure 79 - Principe de la purification par Strep-Tag et d-desthiobiotine<sup>214</sup>

- (1) Agitation de la protéine avec la résine – réaction d'affinité entre la protéine et la résine Strep-Tactin®
- (2) Rinçage de la colonne avec le tampon de rinçage
- (3) Elution de la protéine recombinante par ajout de la d- desthiobiotine.

Par ce procédé de purification, notre protéine possède à son extrémité C-terminale 10 résidus supplémentaires correspondant au Strep-Tag (SAWSHPQFEK) (Figure 79).

Chaque fraction est reconcentrée et analysée par un gel SDS.

### c. Analyse par un gel électrophorèse SDS-PAGE

#### • Principe

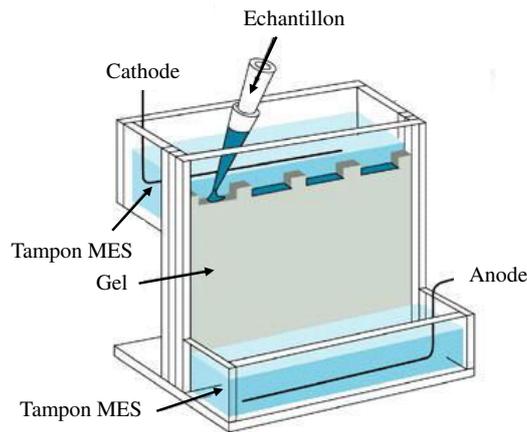
L'électrophorèse SDS-PAGE est une technique qui permet la séparation de protéines selon leur poids moléculaire sous l'influence de champs électriques. Lors de l'utilisation du SDS, détergent dénaturant, toutes les protéines sont chargées négativement, elles migrent donc vers le pôle positif, ce qui permet la séparation des protéines uniquement par leur poids moléculaire.

<sup>214</sup> [www.iba-lifesciences.com/technical-support.html](http://www.iba-lifesciences.com/technical-support.html).

- *Conditions d'analyse*

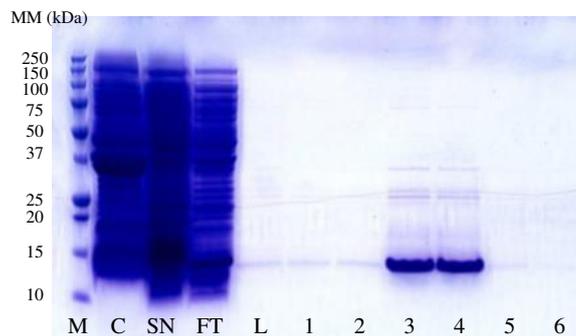
Le gel SDS est un gel en kit Criterion XT 12 puits, le tampon de migration est un tampon MES (2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid), le réactif est préparé avec deux produits : du « *XT buffer sample 4X* » et du « *XT reductor agent 20X* » en proportion 5 : 1.

Chaque échantillon (10 µl) est dilué dans 10 µl d'eau pure et 10 µl de réactif décrit ci-avant. Après avoir porté les échantillons à ébullition, on introduit chaque échantillon dans le puits de la cuve à électrophorèse correspondant (Figure 80).



**Figure 80 - Schéma de l'électrophorèse SDS**

L'électrophorèse dure 45 min à 200 V et 185 mA. La révélation se réalise avec du bleu de Comassie 1X pendant 1 heure, suivi d'un rinçage avec un agent décolorant (Acide acétique 10%, MeOH 10% dans 1 L d'eau pure). On obtient ainsi le gel de toutes les fractions. On les compare à une référence constituée de différentes protéines recombinantes de poids moléculaires connus (10 kDa -250 kDa) que l'on introduit dans le premier puits de l'électrophorèse M sur la Figure 81.



**Figure 81 - Gel d'électrophorèse SDS des fractions de la purification d'USrc**

**M : poids moléculaire de référence, C : Culot, SN : Surnageant, FT : Flow Through, L : lavage, 1-6 : les différentes fractions**

Les deux taches prédominantes dans les fractions 3 et 4 du gel d'électrophorèse correspondent à USrc. Ces fractions 3 et 4 sont rassemblées en un seul échantillon qui est ensuite dosé. On remarque la

présence de notre protéine dans le FT, il est probable que la quantité de billes de résines utilisée n'était pas suffisante pour purifier la protéine.

#### d. Dosage de la protéine c-Src

Le dosage de la protéine est effectué par deux techniques :

- par un appareil optique, Nanodrop, qui mesure l'absorbance à 280nm<sup>215</sup>
- par une courbe d'étalonnage utilisant du BSA (Albumine de Sérum Bovin) de 0 à 1 mg / ml dosé par la méthode du Biuret (réduction du Cu<sup>2+</sup> en condition alcaline). Cette méthode utilise le BCA (acide bicinchonique) comme réactif colorimétrique. Le dosage est mesuré à 562 nm. Le BCA réagit avec les complexes formés de [Cu<sup>2+</sup> - protéine] à 37°C. Lorsqu'il réagit, on obtient une couleur pourpre plus ou moins intense selon la concentration protéique.

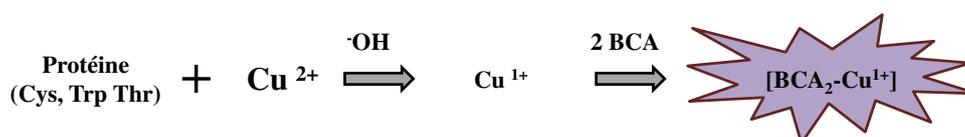


Figure 82 – Principe de la réaction BCA –Cuivre d'après Smith et coll.<sup>216</sup>

A partir de l'outil bioinformatique ProtParam<sup>217</sup>, nous avons obtenu une valeur de masse moléculaire de 9626 g/mol pour USrc.

Le Nanodrop a donné la valeur de **2 mg/ml**, soit une concentration de **0.2 mM** pour notre échantillon protéique. La courbe d'étalonnage obtenue (Figure 83) a estimé une concentration de **2 mg/ml** (soit **0.2 mM**). Ce résultat est en adéquation avec la concentration donnée par le Nanodrop.

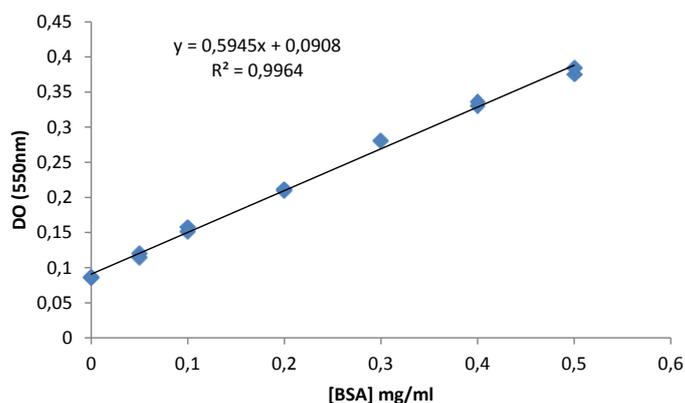


Figure 83 – Courbe d'étalonnage par la méthode Biuret

<sup>215</sup> <http://www.nanodrop.com/>

<sup>216</sup> Smith et al, "Measurement of Protein Using Bicinchoninic Acid", Analytical Biochemistry, 150 (1985), 76–85.

<sup>217</sup> <http://web.expasy.org/protparam/>

## B. Analyse du domaine USrc

L'échantillon de la protéine USrc obtenu est soumis à un changement de solvant afin qu'il soit dans un tampon compatible avec l'analyse RMN, une solution tampon phosphate 50 mM pH 7 avec de l'azoture de sodium ( $\text{NaN}_3$ ) pour maintenir la stabilité de l'échantillon et 10 % de  $\text{D}_2\text{O}$  pour stabiliser le signal. La concentration finale est de 0.4 mM. Une grande majorité des analyses sont réalisées sur un spectromètre :  $B_0 = 11.4 \text{ T}$  ( $\nu_{0(1H)} = 500 \text{ MHz}$ ) équipé d'une sonde 5 mm TXI  $^1\text{H} / ^{13}\text{C} / ^{15}\text{N}$ .

### 1. Analyse de la séquence primaire

Il est possible, à partir de la séquence peptidique d'une protéine ou d'un domaine protéique, d'en prédire le degré de repliement. Le logiciel **IUpred**<sup>218</sup> permet de prédire à partir de la séquence peptidique si la protéine a une tendance ordonnée ou non. L'échelle de probabilité prend les valeurs de 0 à 1 sachant qu'au-dessus de 0.5, la structure de la protéine est considérée comme désordonnée. La prédiction de ce logiciel est basée sur la différence de séquences caractéristiques entre les protéines structurées et désordonnées. Plusieurs facteurs sont pris en compte : la flexibilité, aromaticité des acides aminés, la préférence à former des structures secondaires, le caractère hydrophobe. Cette méthode estime la capacité du polypeptide à former des points de contacts stables. Contrairement aux protéines globulaires (structurées), les IDPs n'ont pas de séquence peptidique capable de former des interactions inter-protéiques. On sait à présent que les IDPs sont principalement composés de résidus polaires, de prolines et dépourvus de résidus hydrophobes. C'est le cœur hydrophobe qui permet de créer les repliements au sein d'une protéine<sup>219</sup>.

La séquence de la protéine USrc a été analysée par ce logiciel (Figure 84).

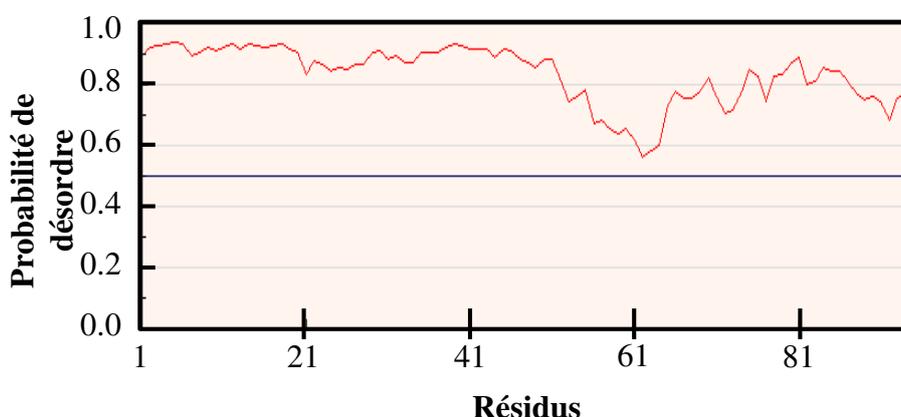


Figure 84 - Probabilité de désordre par IUpred<sup>218</sup>

<sup>218</sup> <http://www.idpbynmr.eu/home/>

<sup>219</sup> Romero, « Sequence complexity of disordered protein », *Proteins*, vol. 42, 2001.

On remarque qu'USrc possède sur toute sa séquence un score supérieur à 0.5, elle est donc définie par ce logiciel comme étant entièrement désordonnée. De plus nous remarquons qu'il y a une baisse du score entre les résidus 60 et 70 (Figure 84), ce qui correspond à la séquence UBLR qui interagit avec la membrane plasmique. Il est probable que cette séquence peptidique est tendance à se structurer lors de cette interaction. Cette observation est en accord avec celle de Pérez et coll<sup>74</sup>, c'est-à-dire que deux régions de USrc : 60 - 64 et 67 – 74, auraient tendance à former des hélices  $\alpha$ .

Les états à longs temps de vie ont montré leur utilité dans l'étude de systèmes biologiques<sup>220, 221</sup>. Nous avons décidé de les exploiter afin d'étudier USrc. Les glycines et les sérines des protéines présentent des protons diastéréotopiques et constituent des sondes idéales dans notre étude, et ce d'autant plus que ces deux résidus sont relativement abondants dans les IDPS en général et dans USrc en particulier. Par ailleurs, la sérine étant phosphorylable, l'étude de ces résidus peut s'avérer être particulièrement intéressante et constituer une méthode innovante notamment dans l'étude des fonctions des biomolécules.

## 2. Attribution des H $\alpha$

Dans l'utilisation des états à longs temps de vie des protons des glycines et sérines d'USrc, il est nécessaire dans un premier temps d'en connaître leurs déplacements chimiques. Pour cela, nous avons réalisé différentes expériences.

Sur le spectre 1D  $^1\text{H}$  d'USrc (Figure 85), on note la présence des protons amides entre 7 et 8 ppm, puis la présence des protons aliphatiques entre 2.5 et 4.5 ppm, et des  $\text{CH}_3$  vers 1 ppm. On remarque que les signaux des protons amides ne s'étalent que sur une faible gamme spectrale, ce qui est une caractéristique des IDPs. Les signaux des différents protons sont complètement superposés sur un spectre monodimensionnel. Il est nécessaire d'éclater l'information dans une seconde dimension. Nous avons, dans un premier temps, effectué une expérience 2D  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC, dont les attributions des  $\text{H}^{\text{N}}$  et  $^{15}\text{N}$  nous avaient été fournies par le groupe de M. Pons, suivie d'une TOCSY 2D afin d'attribuer spécifiquement les H $\alpha$ .

---

<sup>220</sup> Buratto et al, 'Exploring Weak Ligand-Protein Interactions by Long-Lived NMR States: Improved Contrast in Fragment-Based Drug Screening', *Angewandte Chemie*, 53 (2014).

<sup>221</sup> Buratto et al, 'Drug Screening Boosted by Hyperpolarized Long-Lived States in NMR', *ChemMedChem*, 9 (2014).

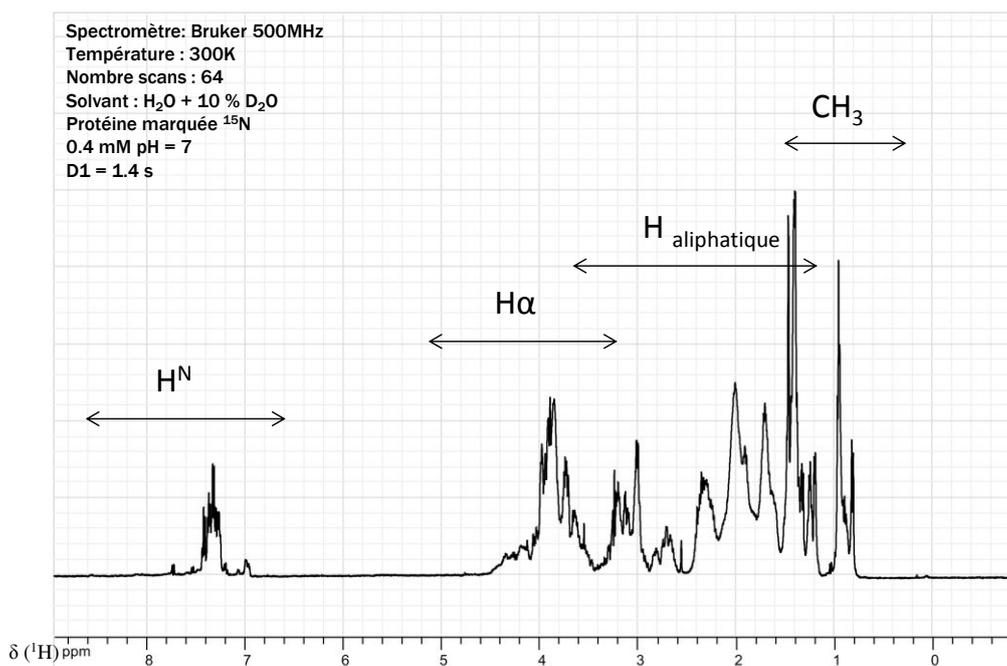


Figure 85 – Spectre <sup>1</sup>H de USrc 0.4 mM dans tampon phosphate 10 % D<sub>2</sub>O à 300 K

L'expérience 2D-HSQC est classiquement utilisée en RMN<sup>222</sup> et permet d'obtenir une seconde dimension et d'améliorer la résolution spectrale. Elle corrèle le noyau <sup>1</sup>H à l'hétéroatome directement lié, ici l'azote <sup>15</sup>N. On obtient les déplacements chimiques du proton lié à l'azote dans une première dimension et ceux de l'azote dans la deuxième. Le spectre résultant présente un signal de corrélation pour chaque paire <sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N (Figure 86).

<sup>222</sup> Bodenhausen et Ruben, « Natural abundance nitrogen-15 NMR by enhanced heteronuclear spectroscopy », Chemical Physics Letters, vol. 69, no 1, 1 janvier 1980

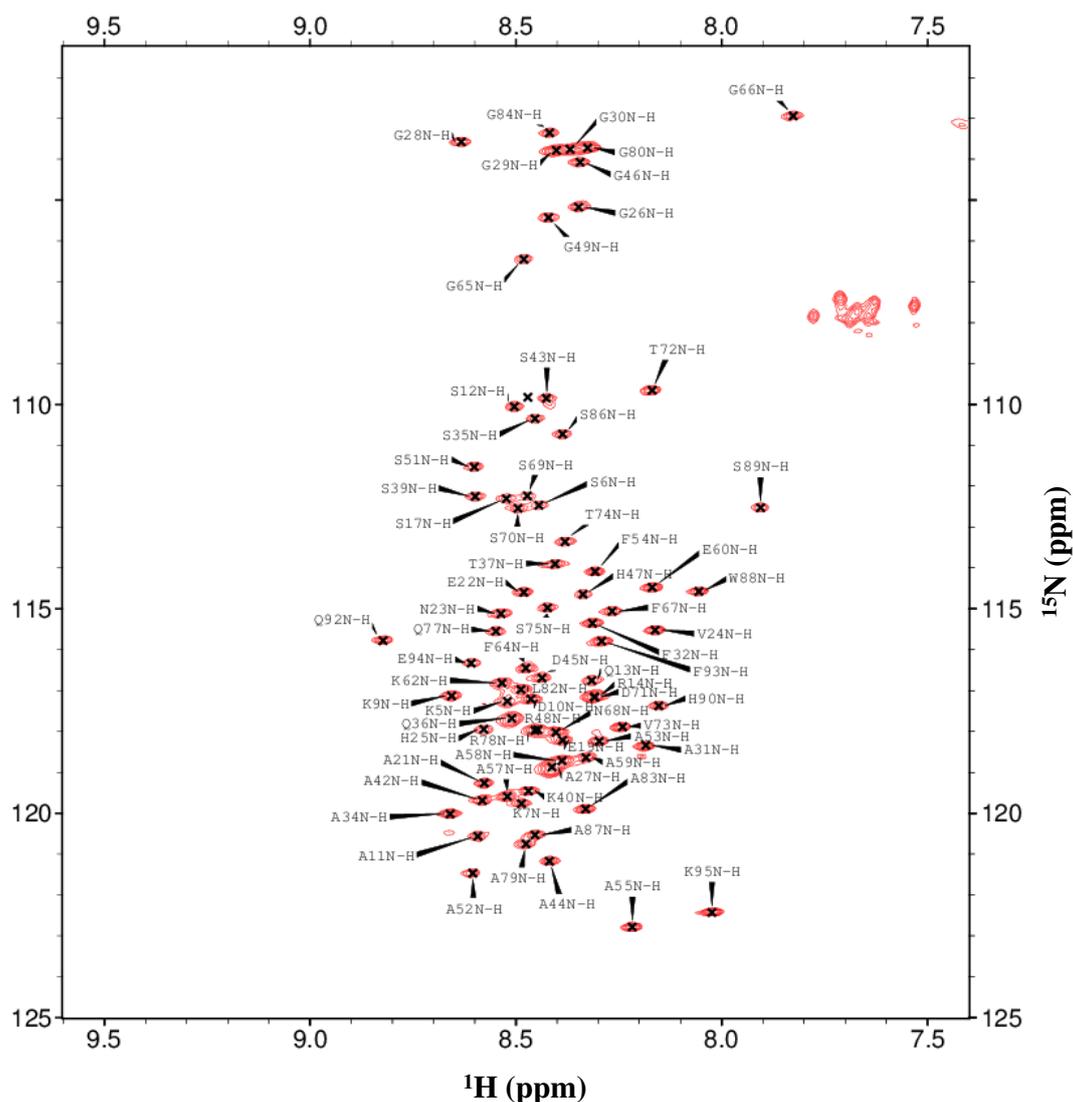


Figure 86 -  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC d'USrc à 0,4 mM obtenue sur un 950 MHz à 298 K

Ce spectre HSQC est également caractéristique d'une protéine qui est (partiellement) désordonnée, on observe une très faible dispersion spectrale (1 ppm) sur l'échelle des  $\text{H}^{\text{N}}$ .

Une fois les résonances  $\text{H}^{\text{N}}$  connues, nous avons réalisé une expérience 2D TOCSY ainsi qu'une 3D TOCSY sur USrc afin d'enlever quelques ambiguïtés sur l'attribution. Bien que les signaux des déplacements chimiques  $\text{H}^{\alpha}$  des différentes glycines soient similaires, nous avons pu attribuer sans ambiguïté les  $\text{H}^{\alpha}$  des glycines **G28** et **G66** et les  $\text{H}^{\beta}$  de la sérine **S89** (Figure 87).

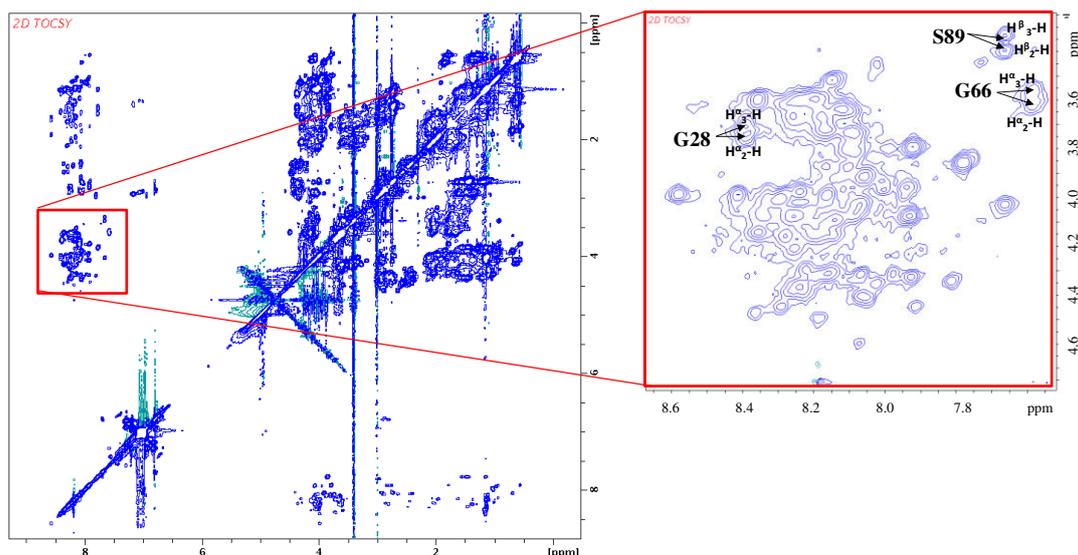


Figure 87 - TOCSY d'USrc à 293K

### 3. Etude de relaxation : mesures de $T_1$ et $T_{LLS}$

Dans cette étude, nous avons mesuré en parallèle, le temps de relaxation longitudinale et celui des LLS. A l'état liquide, le retour à l'équilibre de l'aimantation des noyaux, *i.e.*, la relaxation nucléaire, dépend fortement des mouvements moléculaires. L'équilibration des différences de population entre les états propres de Zeeman est caractérisée par le temps de relaxation « longitudinale »  $T_1$ . Dans le cas des spins 1/2, cette relaxation est principalement issue des interactions dipôle-dipôle entre les moments magnétiques.

On associe les LLS aux surplus ou aux déficits de populations sur des configurations de spins de noyaux couplés avec des symétries avantageuses pour la relaxation. Le retour lent à l'équilibre provient du fait que les LLS sont peu sensibles aux interactions dipôle-dipôle entre les moments magnétiques nucléaires des noyaux impliqués.

Nous avons d'abord mesuré le temps de relaxation longitudinale et celui des LLS correspondant aux protons diastéréotopiques de la glycine du dipeptide Ala-Gly, constituant un système simple. Puis, nous avons réitéré l'expérience sur l'ubiquitine, qui est une protéine dont la dynamique est bien caractérisée et enfin sur USrc, un système plus complexe.

Les séquences utilisées sont décrites ci-après (Figure 88 et Figure 89). La mesure du  $T_1$  se fait en utilisant une séquence d'inversion-récupération (Figure 88) décrite dans le chapitre 1, dans laquelle nous faisons varier le délai  $t$ . Ce délai correspond au temps pendant lequel l'aimantation évolue librement sous l'influence des déplacements chimiques et des constantes de couplages scalaires.

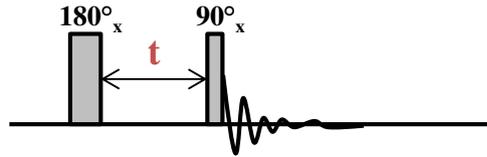


Figure 88 – Séquence d'inversion récupération

Mise en évidence du paramètre d'acquisition  $t$  qui est modifié au cours des expériences

La mesure du  $T_{LLS}$  se fait en utilisant la séquence décrite en Figure 89, dans laquelle nous faisons varier le délai  $\tau_m$ . Ce délai correspond au temps de mélange pendant lequel on applique une impulsion de faible puissance.

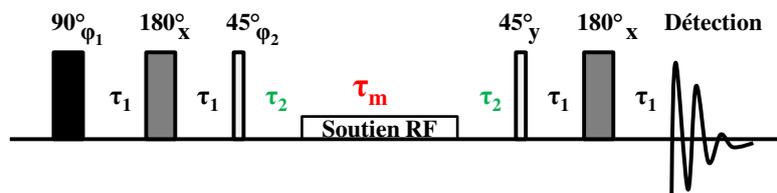


Figure 89 – Séquence d'impulsions LLS

Mise en évidence du paramètre d'acquisition  $\tau_m$  qui est modifié au cours des expériences

$$\varphi_1 = (x, -x) \text{ et } \varphi_2 = (y, y, -y, -y) \text{ et } \tau_1 = 1 / (4J_{IS}) \text{ et } \tau_2 = 1 / (2\Delta\nu_{IS})$$

### a. Mesure de $T_1$ et $T_{LLS}$ sur le dipeptide Ala-Gly

On a choisi d'utiliser le dipeptide **Ala-Gly** possédant un seul système de deux  $^1\text{H}$  couplés sur le  $\text{C}^\alpha$  de la glycine (Figure 90).

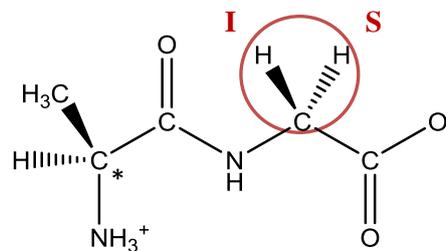


Figure 90 - Le dipeptide Ala-Gly

Sur une analyse classique 1D  $^1\text{H}$  dans  $\text{D}_2\text{O}$ , Ala-Gly est représenté par 3 signaux distincts, car les protons amides sont des protons échangeables avec le solvant ( $\text{D}_2\text{O}$ ) et sont non visibles (Figure 91).

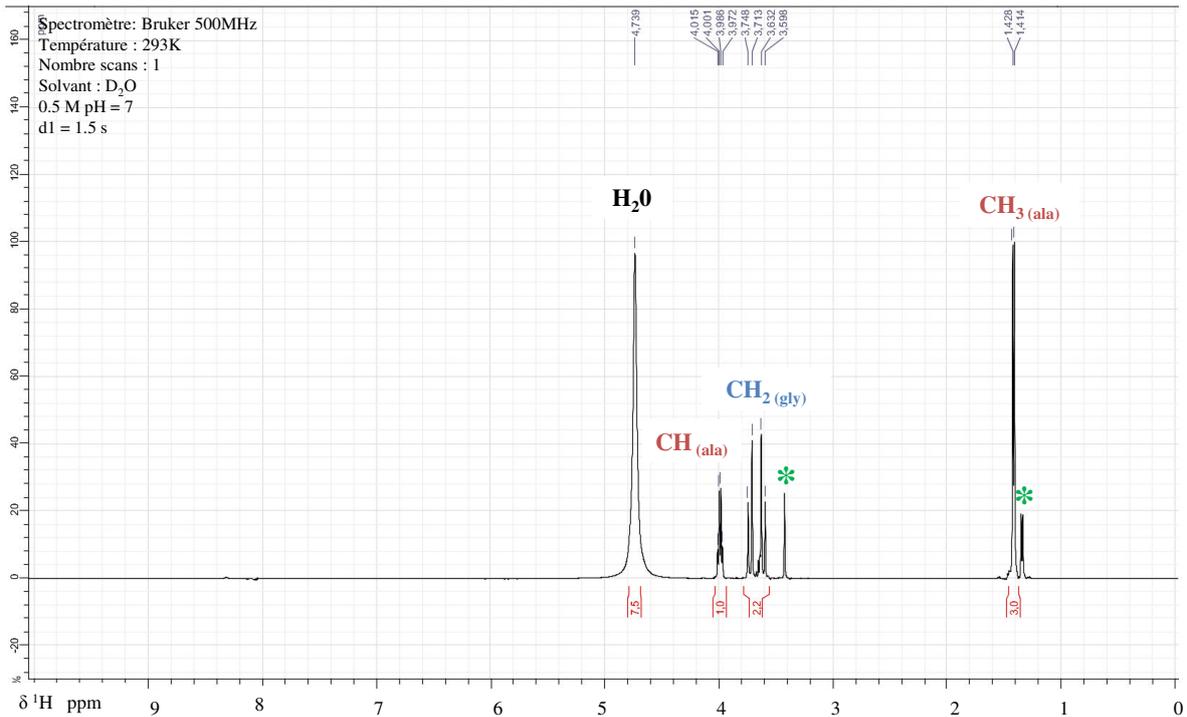


Figure 91 - Spectre 1D  $^1\text{H}$  Ala-Gly à 293 K obtenue sur un 500 MHz

Les signaux indiqués par un astérisque (\*) sont des signaux parasites provenant d'une dégradation de l'échantillon au cours du temps. La glycine présente un doublet pour chacun des protons  $\text{I} = \text{H}^{\alpha 1}$  et  $\text{S} = \text{H}^{\alpha 2}$  (3.77 ppm et 3.66 ppm). Le déplacement chimique moyen est  $\delta_m = 3.71 \text{ ppm}$  et la constante de couplage  $^2\text{J}_{\text{IS}} = 17.6 \text{ Hz}$  (Figure 92).

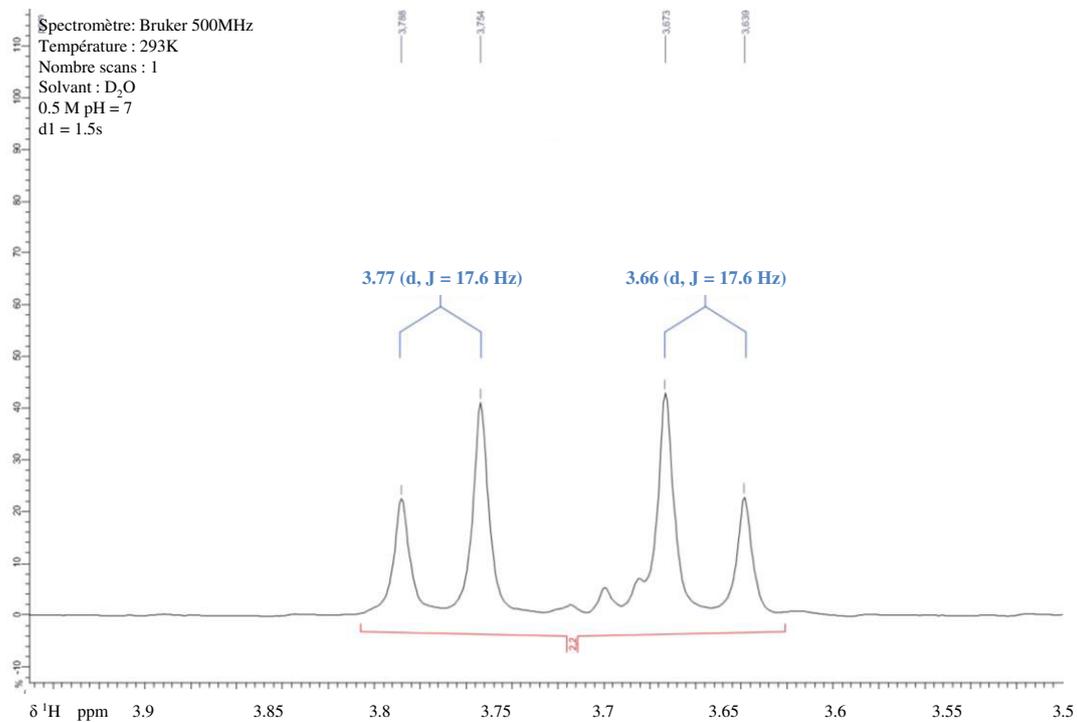
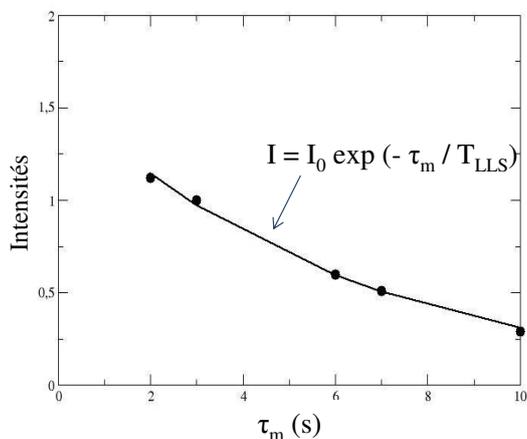


Figure 92 - Signaux de la glycine

La valeur moyenne du temps de relaxation longitudinale pour les H<sup>α</sup> de la glycine pour Ala-Gly est de  $T_I = 3.85$  s, celle  $T_{LLS}$  est de **6.13** s (Figure 89 et Figure 93).

Sur ce système simple, nous obtenons une augmentation d'un **facteur 2** lors de l'utilisation des LLS.

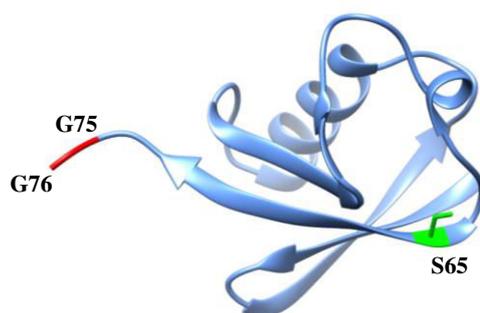


**Figure 93 - Courbe de l'étude LLS des protons H<sup>α</sup> de la glycine du peptide Ala-Gly**

Les cercles pleins représentent les valeurs expérimentales obtenues pour les intensités utilisant la séquence d'impulsion de la figure (Figure 89) ( $\tau_m = 2, 4, 6, 7, 10$  s), et la ligne continue correspond aux valeurs obtenues par un ajustement exponentiel

## b. Mesure sur l'Ubiquitine

Nous avons montré que les LLS étaient capables de suivre la dénaturation de l'ubiquitine par l'Urée<sup>31</sup>. En effet, la plupart des <sup>1</sup>H ont une constante  $T_I = 1$  s, tandis que le  $T_{LLS}$  à l'extrémité C-terminale de l'ubiquitine est plus élevée  $T_{LLS} (G76) = 6.5$  s et très petite au cœur de la protéine  $T_{LLS} (S65) < 1$  s pour la protéine à l'état natif (pH = 7). Cette différence est due à la présence d'interactions dipolaires fortes au cœur de la protéine (Figure 94). Les séquences utilisées sont les mêmes que celles décrites dans le paragraphe précédent.



**Figure 94 – Ubiquitine native (PDB : 1IBQ)**

Mise en évidence G76 et G75 (rouge) et S65 (vert)

Quand on ajoute 8 M d'urée, on n'observe aucun changement pour ce qui est du  $T_I$  et du  $T_{LLS}$  (Tableau 2) de la glycine 76. Ceci peut s'expliquer par le fait que cette glycine étant localisée dans la partie C-terminale de la protéine, est déjà flexible et exposée au solvant dans la forme native. A

l'inverse, la sérine 65 présente un faible  $T_{LLS}$  dans la forme native, caractéristique de régions bien repliées, l'ajout d'urée dans l'échantillon induit une augmentation significative du  $T_{LLS}$  de la sérine 65, alors que le  $T_I$  correspondant ne varie pas. L'augmentation du  $T_{LLS}$  montre bien que la protéine se déplie sous l'ajout d'urée (Tableau 2).

[Urée] M	pH	$T_{LLS} (G76)$ s	$T_{LLS} (G75)$ s	$T_{LLS} (S65)$ s
0	7	6.5	6.3	< 1
8	7	6.4	3.8	12

Tableau 2 - Récapitulatif des valeurs  $T_{LLS}$  de la G76 G75 et S65 au cours de la dénaturation<sup>31</sup>  
La valeur du  $T_I$  ne varie pas pour l'ensemble des 3 résidus étudiés et reste à  $T_I = 1$  s

### c. Mesure sur USrc

Pour USrc, nous avons effectué différentes mesures à 275 K et à 293 K sur un spectromètre opérant à une fréquence  $\nu_{0(1H)} = 500$  MHz. On réalise une succession d'expériences  $T_I$  avec différents délais « t » qui varient de 0.1 ms à 3 s (Figure 95).

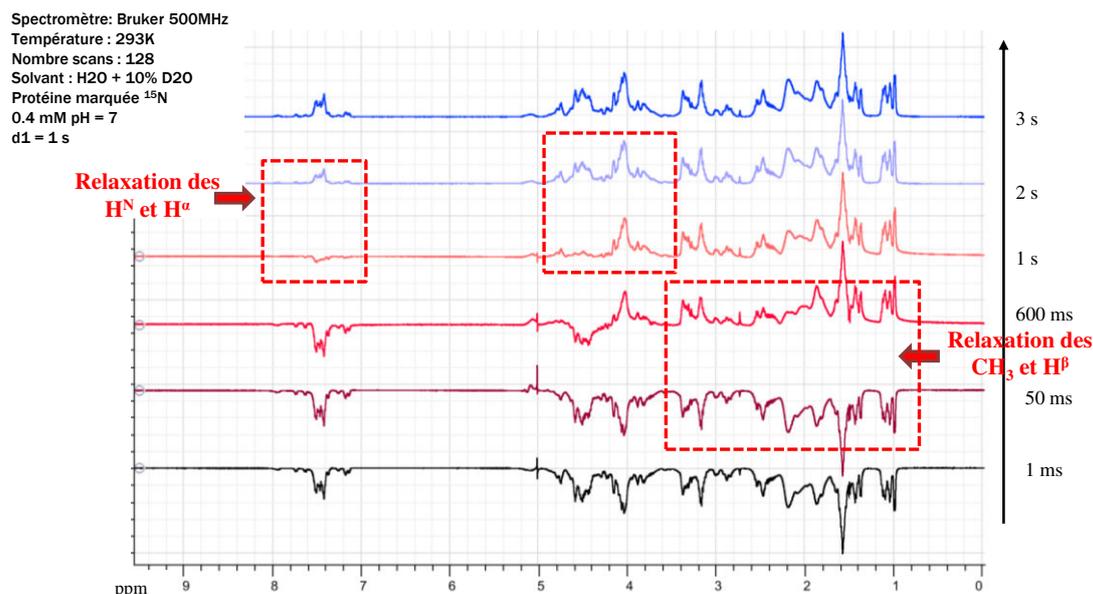


Figure 95 - Spectres 1D proton obtenus par la séquence d'inversion-récupération  
Les délais (de bas vers le haut)  $\tau = 1$  ms, 50 ms, 0.6 s, 1 s, 2 s, et 3 s.

En superposant les différents délais, nous pouvons mettre en évidence que tous les protons ne relaxent pas à la même vitesse. Ce sont d'abord les protons des groupements  $CH_3$  (1 ppm) et  $H^\beta$  (3 ppm) qui relaxent à **0.6 s**, puis les  $H^\alpha$  3 à 4 ppm et  $H^N$  (7 à 8 ppm) qui ne relaxent qu'à partir de **2 s**. On obtient ainsi pour la région des  $H^\alpha$  un  $T_I = 0.65$  à 275 K.

Les signaux  $H^{\alpha}$  des 11 glycines et les  $H^{\beta}$  des 11 sérines présentes dans USrc sont superposés sous un même massif (Figure 96). La valeur de la constante de relaxation obtenue est une moyenne sur l'ensemble du massif des glycines.

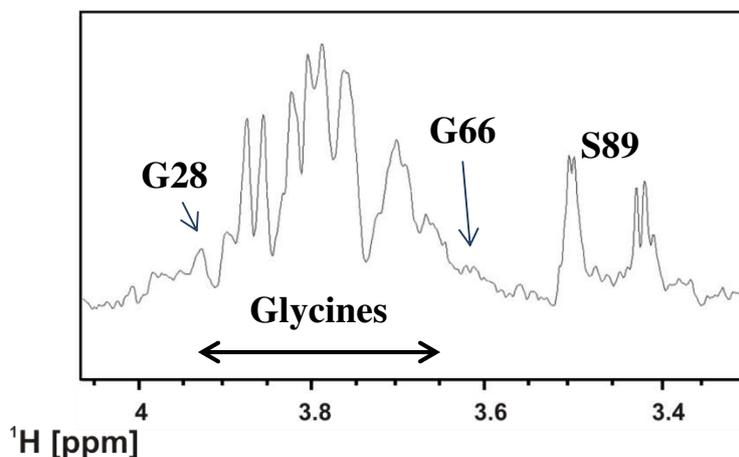


Figure 96 - Spectre 1D LLS 1H, avec un zoom sur la région des glycines,  $\tau_m = 2$  s  
Attribution de trois résidus : glycine 28 (G28), la glycine 66 (G66) et sérine 89 (S89)

Ces expériences  $^1H$  LLS (Figure 98) ont utilisé les paramètres suivants  $\tau_1 = 17$  ms,  $\tau_2 = 9$  ms, indiqués sur la Figure 89, l'amplitude de l'irradiation est de  $\nu_1 = 1000$  Hz pendant des temps d'évolution différents  $\tau_m$ . Six temps de  $\tau_m$  ont été utilisés pour déterminer les constantes de temps (0,4, 0,8, 1,2, 1,8, 2,0 et 2,6 s).

Quand on compare le temps de relaxation longitudinale  $T_1$  au temps de relaxation des LLS  $T_{LLS}$  des glycines, on remarque que les LLS sont caractérisés par un temps de relaxation plus long  $T_{LLS} = 1.79$  s et  $T_1 = 0.65$  s (Figure 97).

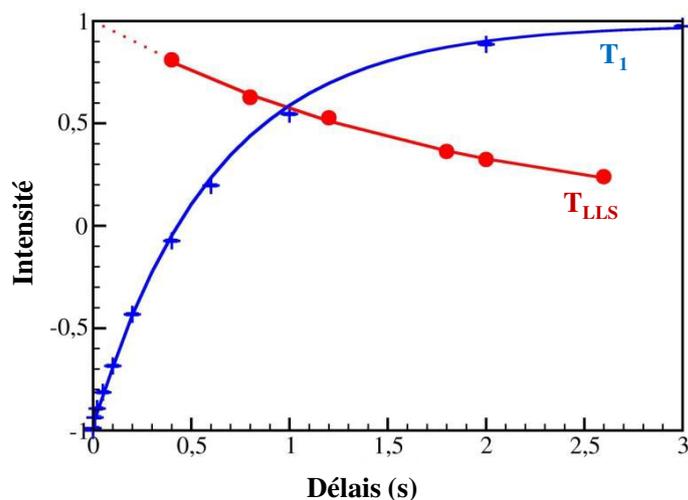


Figure 97 - Courbes des intensités mesurées dans les expériences mettant en jeu les LLS (rouge) et l'aimantation longitudinale (bleu) en fonction du délai de relaxation ( $\tau_m$  et  $t$  respectivement) des glycines d'USrc à 275K

On observe à 275 K une décroissance uniforme entre la relaxation longitudinale et LLS, on obtient une valeur de  $T_I = 0.65$  s et  $T_{LLS} = 1.79$  s pour la région des glycines et un  $T_{LLS} = 1.74$  s pour la sérine 89, soit un rapport  $T_{LLS}/T_I = 2.7$ . Ces expériences ont été répétées à 293 K (Figure 98).

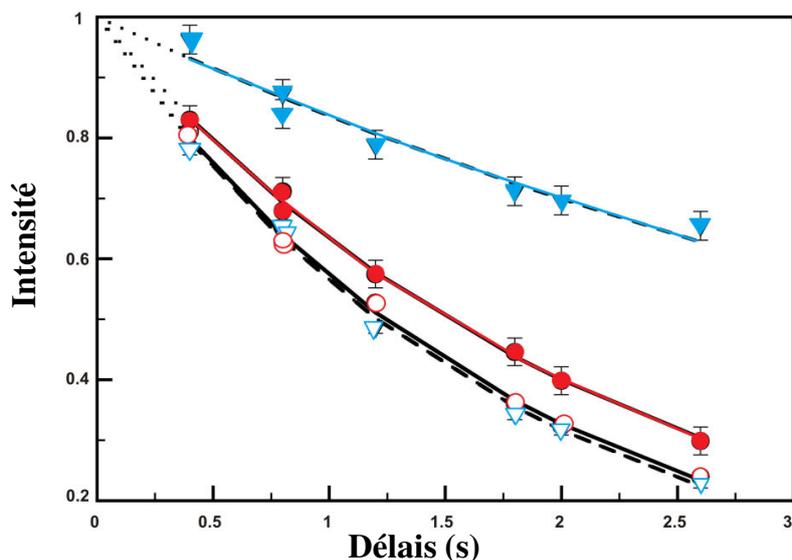


Figure 98 - Courbe de l'étude LLS des glycines et sérine 89

Les courbes rouges représentent les glycines et en bleu la sérine 89. Les motifs pleins ont été enregistrés à 293 K et les motifs en pointillés à 275 K

Les valeurs des  $T_{LLS}$  obtenues en ajustant les intensités mesurées à une décroissance exponentielle sont résumées dans le Tableau 3.

	Glycines	Sérine 89
$T_{LLS} / T_I$ <sup>275 K</sup>	2.7	2.7
$T_{LLS}$ <sup>275 K</sup>	1.79	1.74
$T_{LLS} / T_I$ <sup>293 K</sup>	3.9	7.4
$T_{LLS}$ <sup>293 K</sup>	2.23	4.26

Tableau 3- Valeurs de relaxation des glycines et sérine 89

Ces résultats montrent que le rapport entre les temps de relaxation  $T_{LLS}$  et  $T_I$  est élevé aussi bien pour les glycines et la sérine,  $T_{LLS} / T_I = 2.7$  à 275 K. On gagne ainsi près d'un facteur 3, ce qui démontre que la relaxation LLS est favorable pour le domaine N-terminale de c-Src.

Quand on augmente la température à 293 K, la valeur du rapport  $T_{LLS} / T_I$  augmente à 3.9 pour les glycines ( $T_I$  de 0.57 s et  $T_{LLS}$  de 2.23 s) et 7.4 pour la sérine 89. Ainsi, une augmentation de température a une influence beaucoup plus importante sur la relaxation de la sérine 89 que sur celle des glycines. Dans le cas de la sérine, les protons diastéréotopiques ( $H^B$ ) sont couplés au groupement hydroxyle de la chaîne latérale, dont le proton est en échange avec les protons de l'eau. Une augmentation de température accélère cet échange. Dans le cas des glycines, le proton amide est

également en échange avec le solvant, ce qui pourrait affecter la relaxation LLS, mais l'augmentation de la température à peu d'effet sur le  $T_{LLS}$  des glycines. La faible dépendance des  $T_{LLS}$  des glycines en fonction de la température peut s'expliquer par le fait que la vitesse d'échange du proton amide est beaucoup plus lente que celle du groupement hydroxyle et que les constantes de couplage entre  $H^N$  et les deux  $H^\alpha$  sont proches<sup>223, 224</sup>.

Le manque de résolution causé par le recouvrement des raies spectrales reste une limitation sur les expériences à une dimension. Dans le cas des IDPs, le défi reste à présent de pouvoir distinguer chaque glycine et / ou sérine et de mesurer la relaxation de chacune d'entre elles. Une version 2D d'expérience LLS couplée à une expérience TOCSY a alors été proposée et a permis de résoudre ce problème et d'étendre le champ d'application de cette méthodologie aux IDPs. Une autre technique permettant d'améliorer la résolution est la méthode LLC présentée dans le chapitre 1 « Introduction à la RMN à l'état liquide ».

#### 4. Les protons des sérines en tant que sondes RMN

La sérine est présente dans de nombreuses protéines notamment dans les IDPs (telles que le domaine N-terminal de c-Src qui en compte 11) où elle peut subir une phosphorylation et induire ainsi une réponse aux signaux cellulaires. La sérine est un acide aminé hydroxylé (Figure 99). Elle possède un système de protons diastéréotopiques sur le  $C^\beta$ , *i.e.*, deux  $H^\beta$  couplés, entre autre, au groupement hydroxyle de la chaîne latérale.

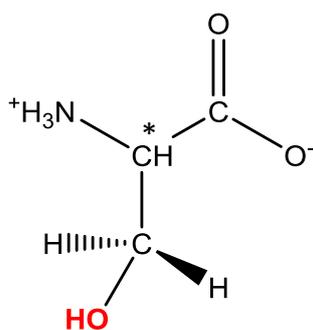


Figure 99 – Sérine

Le spectre 1D de la sérine est relativement simple, composé d'un doublet de doublets pour  $H^\alpha$  et également pour chacun des deux  $H^\beta$  diastéréotopiques (Figure 100). En effet, le proton  $H^\alpha$  est couplé à chacun des deux  $H^\beta$  avec les constantes de couplage  $^3J_{HH1}$  et  $^3J_{HH2}$ . Chaque  $H^\beta$  est quant à lui, couplé à l'autre  $H^\beta$  avec une constante de couplage  $^2J_{HH}$ , ainsi qu'au  $H^\alpha$  avec une constante  $^3J_{HH1}$  ou  $^3J_{HH2}$ .

<sup>223</sup> Pileio, « Singlet state relaxation via scalar coupling of the second kind », The Journal of Chemical Physics, vol. 135, no 17, 7 novembre 2011.

<sup>224</sup> Liepinsh et al., « NMR spectroscopy of hydroxyl protons in aqueous solutions of peptides and proteins », Journal of biomolecular NMR, vol. 2, no 5, septembre 1992.

Le doublet de doublets du  $H^\alpha$  est caractérisé par un déplacement chimique de  $\delta = 3.79$  ppm avec les constantes,  ${}^3J_{HH1} = 5.4$  Hz et  ${}^3J_{HH2} = 4$  Hz. Le déplacement chimique du doublet de doublets de  $H^{\beta1}$  est de  $\delta = 3.89$  ppm avec les constantes  ${}^3J_{HH1} = 5.4$  Hz et  ${}^2J_{HH2} = 12.4$  Hz, celui du doublet de doublets de  $H^{\beta2}$  est de  $\delta = 3.94$  ppm avec les constantes  ${}^3J_{HH2} = 4$  Hz et  ${}^2J_{HH2} = 12.4$  Hz.

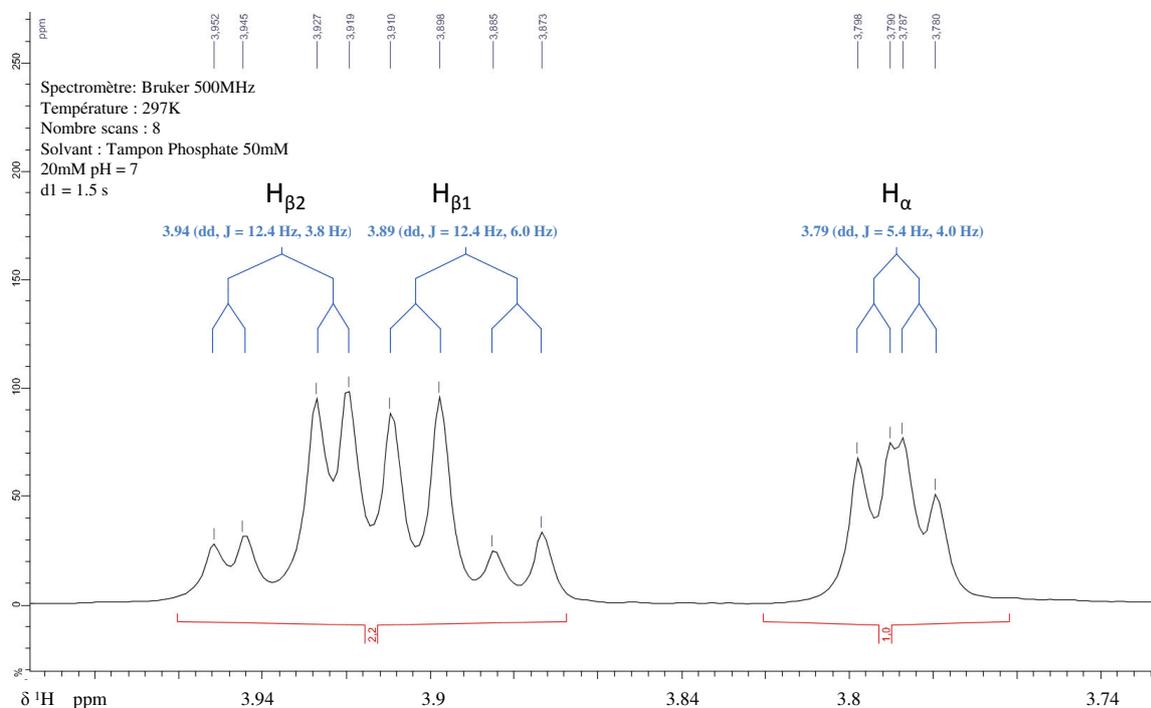


Figure 100 - Spectre 1D proton Sérine 20 mM dans tampon phosphate 50 mM pH 7

L'objet de notre étude est de déterminer si la présence de ce proton hydroxyle a une influence sur la relaxation des états à longs temps de vie du système de spins couplés, essentiellement *via* l'échange chimique avec le solvant. Nous avons utilisé les états à longs temps de vie, LLS excités sur le système de spin ( $H^\alpha$ ,  $H^{\beta1}$ ,  $H^{\beta2}$ ). Ces états sont des combinaisons linéaires des LLS ( $H^\alpha$ ,  $H^{\beta1}$ ), LLS ( $H^\alpha$ ,  $H^{\beta2}$ ), LLS ( $H^{\beta1}$ ,  $H^{\beta2}$ ) dans lesquelles la dernière composante est majoritaire. Nous avons mesuré les temps de relaxation à différents pH.

### a. L'échange chimique

L'échange chimique est important pour l'analyse RMN des systèmes biologiques<sup>225</sup>. Il représente le transfert d'un noyau d'un groupement vers un autre. Il en existe différentes sortes. La première est l'échange d'un proton d'un groupement hydroxyle ou amine avec le proton du solvant (Figure 101).

<sup>225</sup> Lane et Lefèvre, « Nuclear magnetic resonance measurements of slow conformational dynamics in macromolecules », Methods in Enzymology, vol. 239, 1994.

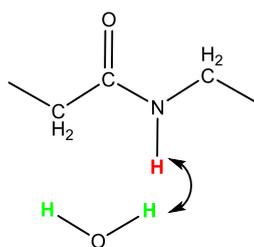


Figure 101 - Echange du proton amide avec le proton de l'eau

Dans cet exemple, le déplacement chimique, ainsi que la constante de couplage entre les deux protons sont très différents.

Un autre exemple est l'échange des protons entre les molécules d'eau qui forment des liaisons hydrogènes (Figure 102). L'échange entre protons du solvant est très rapide, on a alors une coalescence des signaux, soit un seul signal RMN pour tous les protons des molécules d'eau.

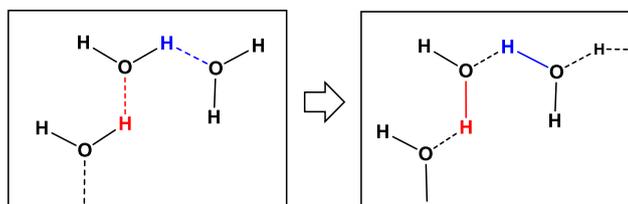


Figure 102 - Echange de protons entre les molécules d'eau du solvant

Les effets de l'échange chimique dans l'équation de Bloch ont tout d'abord été modélisés par McConnell<sup>226</sup> et revus par Forsén et Hoffman<sup>227</sup> en 1960.

Dans le cas le plus simple, considérons deux protons A et B appartenant à deux molécules différentes, et ayant une différence de déplacement chimique  $\Delta\nu$ . L'échange entre ces deux protons est caractérisé par une constante  $k$ . Quand l'échange est lent ( $k \ll \Delta\nu$ ), on n'observe deux signaux, un déplacement chimique résolu et défini pour chaque proton. Quand l'échange correspond à  $k = \Delta\nu$ , on obtient un signal très large et peu intense. Quand  $k \gg \Delta\nu$ , on n'observe plus qu'un seul signal moyenné des déplacements chimiques des deux protons (Figure 103).

<sup>226</sup> McConnell, « Relaxation rates by nuclear magnetic resonance. », vol. 28, 1958.

<sup>227</sup> Forsén et Hoffman, « Study of moderately rapid chemical exchange reactions by means of nuclear magnetic double resonance », vol. 39, 1963.

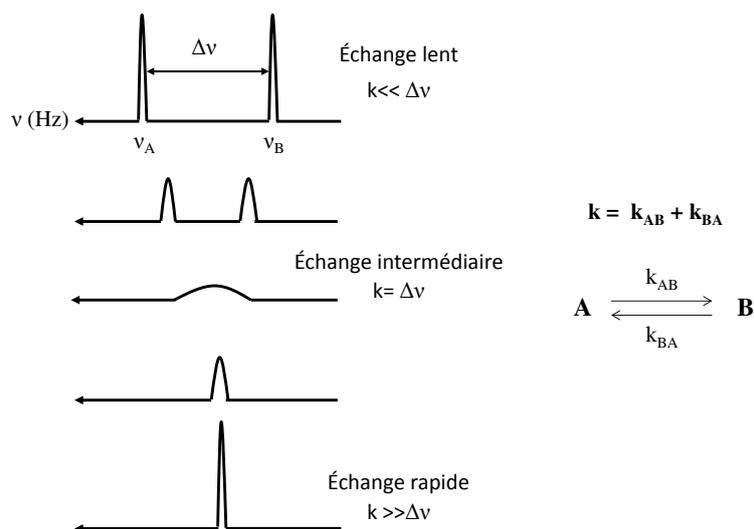


Figure 103 – Spectres correspondant aux différents régimes d'échange

Deux paramètres extérieurs peuvent influencer l'échange chimique, la température et le champ magnétique. Lorsqu'on augmente la température l'échange s'accélère, à l'inverse, quand le champ magnétique augmente, l'échange est ralenti.

## b. Analyse des LLS de la sérine à différents pH

### • Les différents tampons utilisés

Afin de couvrir une gamme de pH 3 à 12, nous avons dû préparer plusieurs solutions tampon à une concentration de 50 mM. Les analyses à pH 4 et 5 ont été effectuées dans un **tampon acétate**. Le **tampon phosphate** couvre les analyses à pH 6 et 7. Ce tampon est préparé à partir d'un mélange de solutions d'acide  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  et de base  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  jusqu'à l'obtention du pH de voulu. Le **tampon Tris** a été utilisé pour les analyses à pH 8 et 9. Et enfin pour le tampon basique, nous avons utilisé le **tampon carbonate** préparé à partir du  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  solide dilué dans de l'eau pure. Le pH de chaque échantillon a été ajusté avec des solutions de  $\text{NaOH}$  1N et  $\text{HCl}$  1N.

Le protocole détaillé de la préparation est présenté en annexe (B).

Pour chacun de ces échantillons nous avons mesuré les temps de relaxation des états à longs temps de vie ( $T_{LLS}$ )

### • Mesure des temps de relaxation des états à longs temps de vie ( $T_{LLS}$ )

Les échantillons de sérine ont été préparés à partir de la L-Sérine (Sigma-Aldrich) afin d'obtenir une concentration de 20 mM. Chaque échantillon possède un volume de 500  $\mu\text{l}$ , dont 50  $\mu\text{l}$

D<sub>2</sub>O. Les expériences ont été réalisées sur un spectromètre de  $\nu_0 = 500$  MHz équipé d'une sonde 5 mm TXI <sup>1</sup>H / <sup>13</sup>C / <sup>15</sup>N, et à une température de 295 K.

La séquence 1D utilisée est une séquence permettant d'exciter les états à longs temps de vie (LLS) à la fin de laquelle est ajoutée une WaterGate (WG) pour la suppression du signal de l'eau (Figure 104).

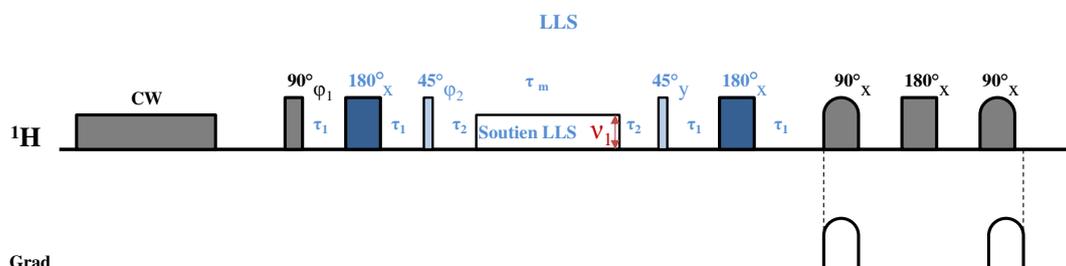


Figure 104- Séquence 1D LLS WG

Lorsqu'on compare les différents spectres 1D de la sérine aux différents pH (Figure 105), on remarque un léger déplacement de ces signaux qui est plus prononcé pour le tampon carbonate (spectres rose et violet). Ce phénomène peut être expliqué par le changement de tampon entre les expériences. On remarque également la présence d'un signal supplémentaire sur les spectres du tampon tris (spectres jaune et orange), celui-ci appartient au composé Tris qui est visible en RMN, mais celui-ci n'interfère ni à l'analyse ni à l'étude portée sur la sérine.

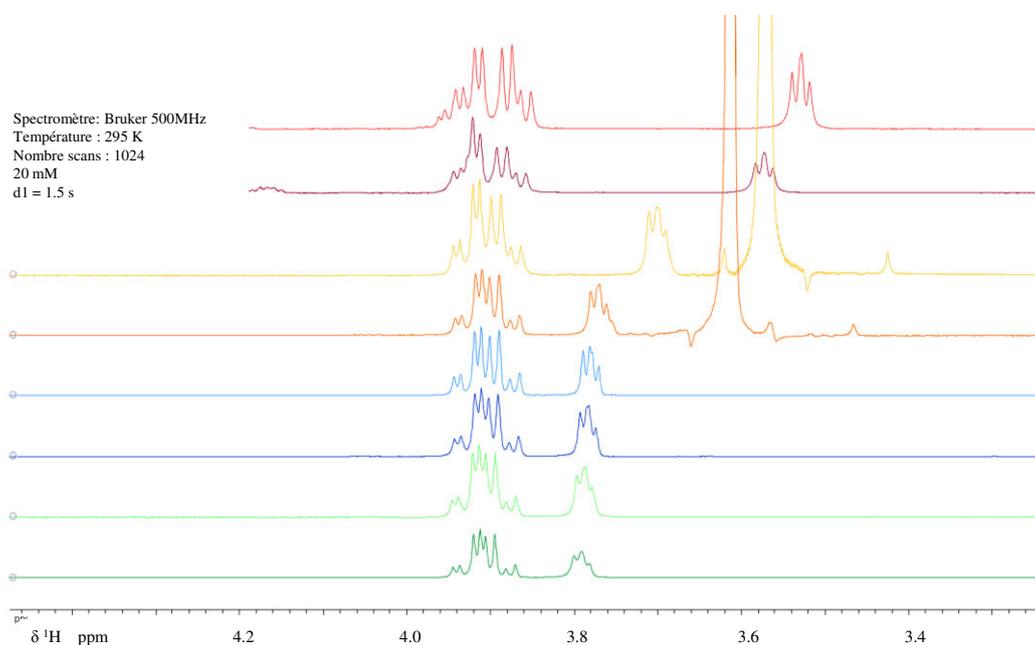


Figure 105 - Spectres 1D de la sérine à différents pH : 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 (de bas en haut)

Le tableau et la courbe ci-après résument les valeurs  $T_{LLS}$  obtenues pour une amplitude  $\nu_1 = 200$  MHz (Tableau 4 et Figure 106).

pH	4	5	6	7	8	9	10	11
$T_{LLS}$ (S)	6.288	7.773	5.490	4.469	1.749	4.391	6.424	5.893

Tableau 4 - Valeurs des  $T_{LLS}$  de la sérine en fonction du pH

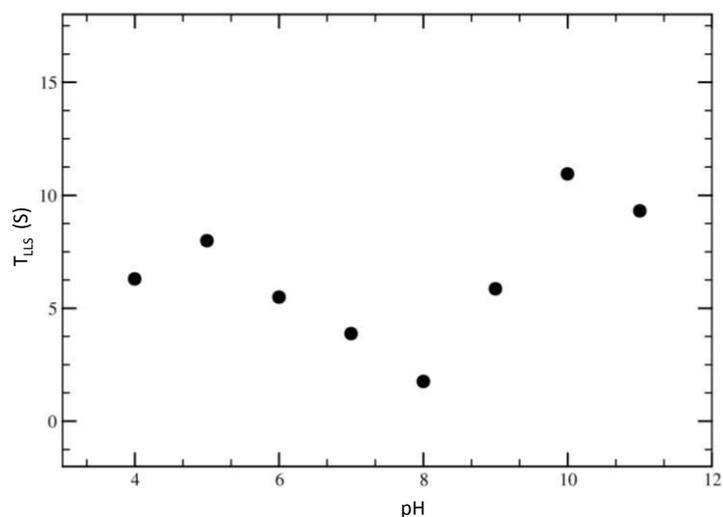


Figure 106 - Courbe des  $T_{LLS}$  en fonction du pH

On observe ainsi que les  $T_{LLS}$  varient en fonction du pH avec une courbe en « V » dont le point d'inflexion est situé aux alentours de pH = 8 et qui est similaire à celle obtenue par Liepinsh et coll. pour  $k_{ex}$  en fonction du pH<sup>224</sup>.

## 5. Etude LLC

L'aimantation transverse peut être distribuée sur des noyaux couplés de manière à augmenter son temps de relaxation caractéristique. Cette aimantation prend alors la forme de cohérences à longs temps de vie (LLC)<sup>5</sup>. Les LLC permettent de réduire la largeur des raies, donnant la possibilité d'améliorer la résolution au-delà de l'effet de l'intensité du champ magnétique principal (Figure 107).

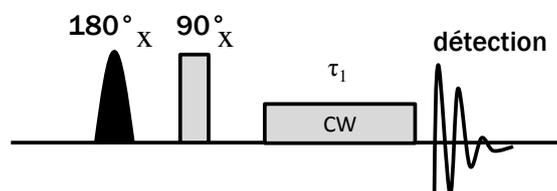


Figure 107 - Séquence d'impulsions LLC avec CW = soutien LLC

### a. Mise au point sur Ala-Gly

L'étude des LLC de Ala-Gly n'apporte pas de la résolution spectrale, dû à la présence d'un seul système de spins couplés, mais cet échantillon est idéal pour mettre au point cette technique.

Différents paramètres doivent être ajustés pour appliquer les LLC : le point d'application du champ  $B_1$  par rapport au centre des deux doublets (« A » sur la Figure 108), la constante de couplage  $J_{IS}$  entre les deux protons diastéréotopiques et leur différence de déplacement chimique  $\Delta\nu_{IS}$  (Figure 108).

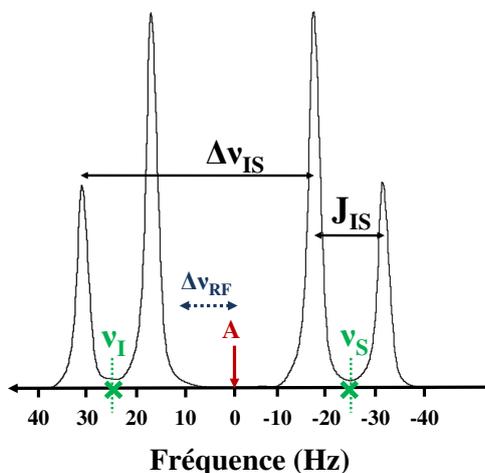


Figure 108 - Spectre 1D des doublets des protons de la glycine montrant les paramètres importants avec  $A = \frac{\nu_I - \nu_S}{2}$

Ici les deux protons diastéréotopiques de la glycine  $I = H^{\alpha 1}$  et  $S = H^{\alpha 2}$ ,  $\Delta\nu_{IS} = 55.9$  Hz, et  $J_{IS} = 17.6$  Hz à  $B_0 = 11.4$  T ont été analysés.

Si on applique le champ  $B_1$  exactement au centre des deux doublets, à « A », soit  $\Delta\nu_{RF} = 0$  Hz, la position des doublets dans la dimension indirecte (deuxième dimension) par rapport à la porteuse  $\nu_{LLC}$  est équivalente à la valeur du couplage  $J_{IS}$ . Par contre si,  $\Delta\nu_{RF} \neq 0$  Hz, la fréquence d'évolution est de  $\nu'_{LLC} > J_{IS}$  (Figure 109). Ainsi, les LLC devraient permettre de séparer les signaux dans une seconde dimension.

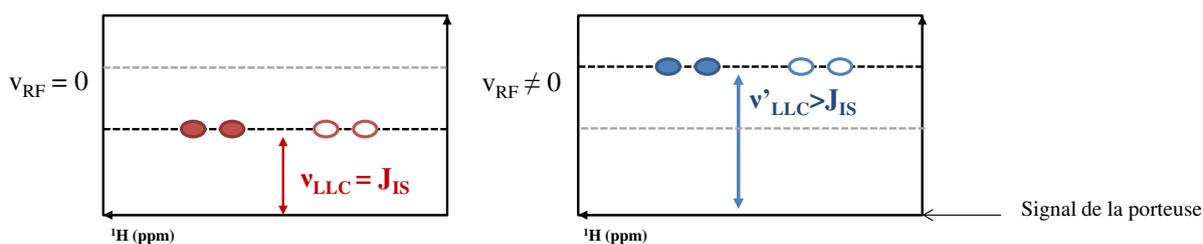
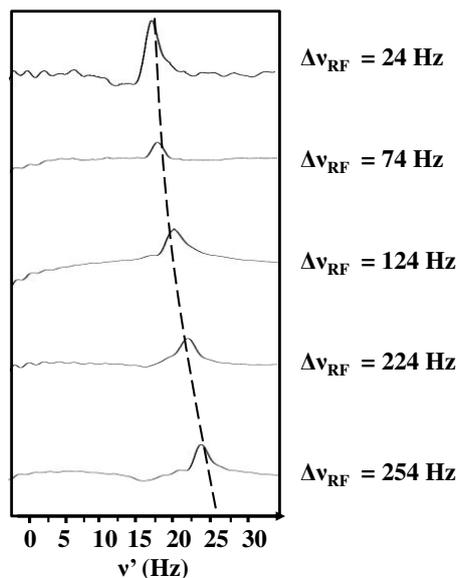


Figure 109 - Schéma explicatif de la 2D obtenue par la méthode LLC

Le travail préliminaire a été d'observer ce changement de position des doublets de la glycine dans la dimension indirecte. Une première expérience a été de faire varier le point d'application  $\Delta\nu_{RF}$  de l'irradiation avec une séquence d'impulsions d'onde continue (CW - continuous wave – soutien LLC) d'amplitude  $\nu_1 = 800$  Hz. Nous avons fait varier les valeurs de  $\Delta\nu_{RF}$  de 20 Hz à 250 Hz (Figure 110).

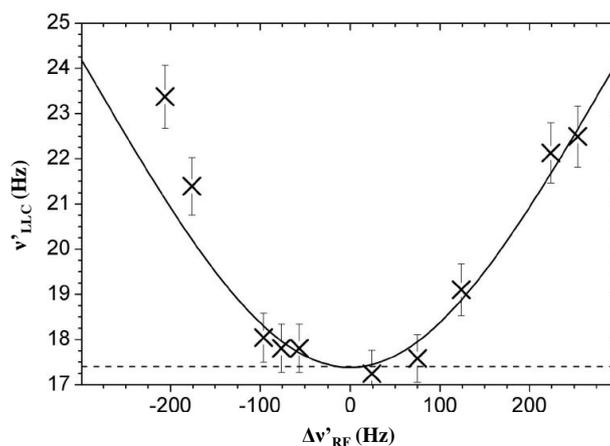


**Figure 110 - Projection 1D de la dimension indirecte des spectres obtenus pour  $\nu_1 = 800$  Hz**

**Expériences obtenues sur un spectromètre 500 MHz à 300 K**

**Les valeurs de  $\Delta\nu_{RF}$  (de haut en bas) 24 Hz, 74 Hz, 124 Hz, 224 Hz, et 254 Hz.**

Nous analysons la projection 1D de la dimension indirecte afin d'observer et de mesurer les valeurs de déplacements chimiques de ces doublets (Figure 110). Il existe une différence de position entre la première expérience qui correspond à la plus petite valeur de  $\Delta\nu_{RF}$  et la dernière expérience, qui correspond à la plus grande valeur de  $\Delta\nu_{RF}$  (Figure 110). La différence entre les deux valeurs extrêmes reste faible mais une différence de **4 Hz** est observable sur un spectre RMN. Les mêmes expériences LLC sur Ala-Gly ont été obtenues par le logiciel GAMMA (réalisé par le Dr Balzan)<sup>228</sup>. Les valeurs par simulation (ligne continue sur la Figure 111) sont représentées sur la courbe d'évolution de la fréquence  $\nu'_{LLC}$  des  $H^a$  de la glycine en fonction de la variation de la position de l'irradiation,  $\Delta\nu_{RF}$ . Celle-ci est une hyperbole dont le minimum est la valeur obtenue pour  $\Delta\nu_{RF} = 0$ . Ces résultats sont comparables aux valeurs expérimentales (Figure 111).



**Figure 111 - Comparaison de la simulation et des valeurs expérimentales des LLC sur Ala-Gly**

**Les valeurs obtenues par simulation sont représentées par la ligne continue et les valeurs expérimentales par les croix.**

<sup>228</sup> <https://scion.duhs.duke.edu/vespa/gamma>

Une seconde expérience consistait à varier la puissance de la séquence de découplage de  $\nu_1 = 800$  Hz, 1200 Hz et 2000 Hz. La variation du paramètre  $\Delta\nu_{RF}$  a de moins en moins d'effet au fur et à mesure que la puissance augmente. Quand on compare les valeurs extrêmes,  $\Delta\nu_{RF} = 24$  Hz,  $-204$  Hz et  $+204$  Hz, on remarque que pour une amplitude  $\nu_1 = 2000$  Hz, on n'observe aucune variation de déplacement chimique (Figure 112). On observe une faible variation pour  $\nu_1 = 1200$  Hz, mais les conditions idéales sont celles obtenues pour CW  $\nu_1 = 800$  Hz (Figure 112).

On remarque ainsi que la position du signal des  $H^\alpha$  de la glycine par rapport à la porteuse dans la dimension indirecte augmente lorsque  $|\Delta\nu_{RF}|$  augmente. Cet effet est plus prononcé lorsque  $\nu_1$  est faible et les résultats expérimentaux concordent avec les valeurs théoriques.

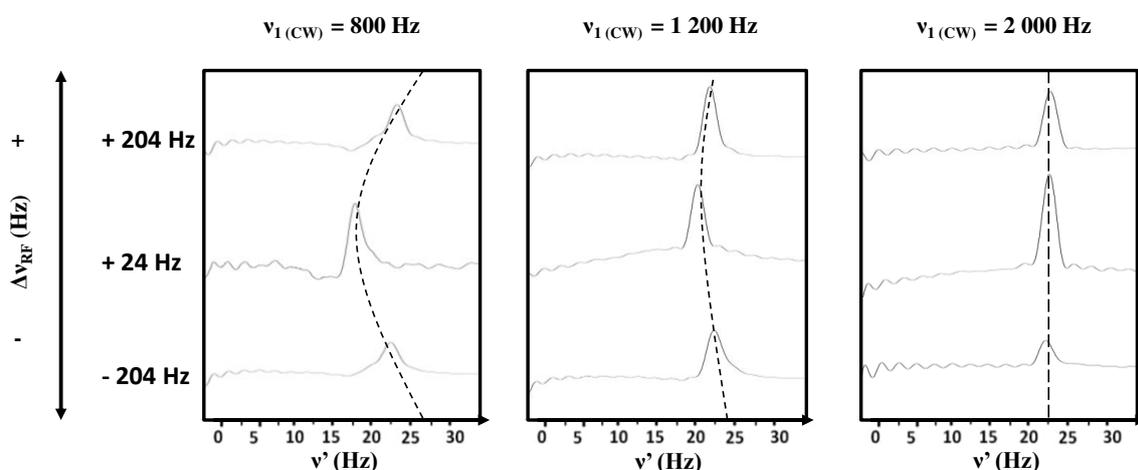
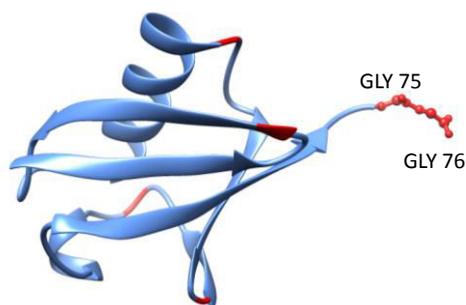


Figure 112 - Projection 1D de la dimension indirecte des spectres obtenus pour  $\nu_1 = 800$  Hz, 1200 Hz et 2000 Hz

### b. Application sur l'Ubiquitine

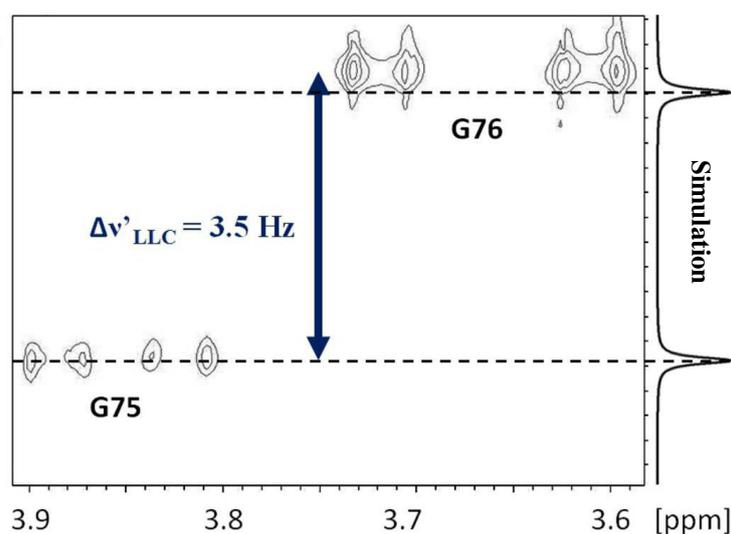
Les résultats obtenus sur un système simple sont très prometteurs. On arrive à faire varier la distance à la porteuse des signaux des protons diastéréotopiques en faisant varier  $\Delta\nu_{RF}$ . On espère ainsi pouvoir séparer dans une seconde dimension des signaux regroupés sur un spectre 1D proton. L'Ubiquitine (2 mM, Tampon phosphate pH 7) est une petite protéine d'origine humaine, composée de 76 acides aminés et qui comprend six glycines. Deux de ces glycines (Gly 75 et Gly 76) sont localisées au niveau de l'extrémité C-terminale qui est caractérisée par sa grande flexibilité (Figure 113).



**Figure 113 - Structure 3D de l'Ubiquitine humaine (PDB : 1UBQ)**

Les six glycines sont mises en évidence en rouge et les glycines 75 et 76 sont identifiées à l'extrémité C-terminale.

A 298 K, une expérience LLC a été réalisée en appliquant une irradiation de soutien CW au centre des deux doublets de la **glycine 75**, pour laquelle  $\Delta\nu_{RF} = 0$  Hz, alors que pour le doublet de doublet du  $H^{\alpha}$  de la **glycine 76**,  $\Delta\nu_{RF} = 100$  Hz. Le couplage  $J_{IS}$  est d'environ **17 Hz** pour les deux résidus. Les signaux des  $H^{\alpha}$  des glycines 75 et 76 sont ainsi séparées dans une seconde dimension avec une différence de  $\Delta\nu'_{LLC} = 3.5$  Hz (Figure 114).



**Figure 114 - Spectre LLS 2D de l'ubiquitine humaine, réalisé sur un spectromètre opérant à 600 MHz à 298 K avec une puissance de découplage  $\nu_1 = 800$  Hz.**

La concentration de l'échantillon est de 2 mM dans un tampon phosphate à pH 7.

Cette expérience est en accord avec la prédiction des simulations LLC sur cette protéine (lancé par le Dr Balzan), où l'on avait prédit un  $\Delta\nu'_{LLC} = 3.2$  Hz (valeur indiquée en pointillés sur la Figure 114).

La technique LLC présentée ici permet de séparer des systèmes de spins couplés sur un système simple, Ala-Gly, mais également sur un système plus complexe tel que l'Ubiquitine. Nous l'avons ensuite testée sur le domaine N-terminale de c-Src.

### c. Application sur USrc

Nous avons obtenu un résultat à partir des premiers essais effectués sur la protéine USrc à 0.4 mM sur un spectromètre à haut champ 950 MHz à 293 K<sup>229</sup>.

Deux expériences 2D LLC ont été enregistrées en utilisant la séquence donnée ci-après (Figure 115). Une première impulsion correspondant à un 180° est appliquée sur le massif des glycines à 3.78 ppm et une seconde est appliquée sur la glycine 28 à 3.98 ppm soit un  $\Delta\nu_{RF} = 288$  Hz par rapport à la porteuse pour la première impulsion sélective et un  $\Delta\nu_{RF} = 93$  Hz pour la seconde. Ensuite on effectue un 90° suivi d'une irradiation CW soutien LLC pendant un temps  $\tau_1$  (Figure 115). Deux expériences ont été acquises avec des amplitudes différentes:  $\nu_1 = 800$  Hz et 1520 Hz (Figure 116).

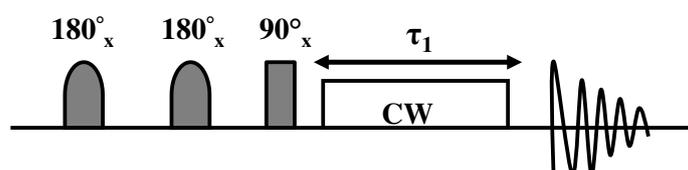


Figure 115 – Séquence impulsions 2D LLC

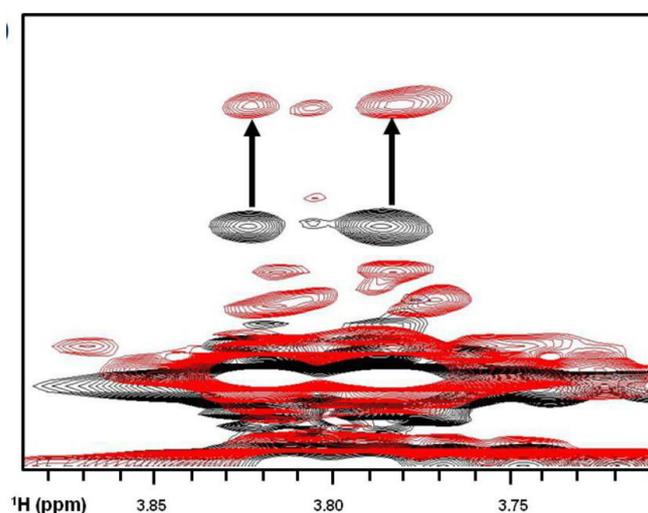


Figure 116 - Spectre 2D LLC d'USrc obtenu à 950MHz

Le spectre en rouge correspond à  $\nu_1 = 800$  Hz et en noir  $\nu_1 = 1520$  Hz

On remarque que lorsqu'on diminue l'amplitude d'irradiation  $\nu_1$ , on est capable de mieux séparer les signaux du massif dans une seconde dimension. On voit ainsi avec l'amplitude  $\nu_1 = 800$  Hz (spectre rouge), l'apparition de quatre nouveaux signaux qui étaient cachés dans l'ensemble du massif à  $\nu_1 = 1520$  Hz (spectre noir de la Figure 116).

<sup>229</sup> TGIR-RMN-THC Fr3050 CNRS

## C. Conclusion générale sur l'analyse de USrc

L'extrémité N-terminale de c-Src a été exprimée à partir d'un plasmide pET14b transfecté dans les bactéries Rosetta. Ces bactéries ont la particularité de pouvoir synthétiser des codons rares, présents dans la séquence ADN de notre protéine. Après une expression et une purification classique, nous obtenons une protéine marquée en  $^{15}\text{N}$  comprenant 95 acides aminés, dont 10 correspondent au Strep-Tag qui permet la purification par colonne d'affinité.

Cette extrémité N-terminale de c-Src est caractérisée par une grande flexibilité, sa structure ne peut être déterminée par cristallographie à rayons X. L'étude de la relaxation et de la dynamique par RMN est plus adaptée pour obtenir des informations. Nous avons analysé cette protéine par différentes techniques. L'analyse 2D, comme l'analyse 1D, a montré que cette protéine est désordonnée.

Nous avons décrit une méthode permettant la mesure des constantes de temps de relaxation des états de spins à longs temps de vie ( $T_{LLS}$ ) dans la protéine intrinsèquement désordonnée. Ainsi, nous avons montré que les LLS peuvent être utilisés pour mettre en évidence les interactions inter ou intramoléculaire dans une protéine flexible, intrinsèquement désordonnée (IDPs). Cependant, le manque de résolution causé par le recouvrement des raies spectrales reste une limitation sur les expériences à une dimension. Une version 2D d'expérience LLS couplée à une expérience TOCSY a alors été proposée et a permis de résoudre quelques problèmes de résolution.

Les temps de relaxation LLS ont été moyennés sur l'ensemble des signaux des 11 glycines et 10 sérines présentes, seul le  $T_{LLS}$  de la sérine 89, dont le signal est bien isolé sur le spectre 1D, a pu être mesuré spécifiquement. Ces études ont montrés que les LLS ont des temps de relaxation pouvant aller jusqu'à  $T_{LLS} = 3 T_l$  dans le cas de cette IDP. Nous avons également utilisé les LLC afin de séparer dans une deuxième dimension les glycines et sérines. Nous avons également montré l'influence de la température sur les  $T_{LLS}$ , ce qui permettait d'identifier des résidus possédant une dynamique moléculaire particulière propre aux IDPs. En nous référant aux états à longs temps de vie qui peuvent être observés pour les résidus serine et au fait que ces derniers peuvent être phosphorylés dans les IDPs, les LLS des sérines phosphorylées pourraient être un outil prometteur dans l'étude structurale et dans la compréhension des mécanismes de régulation des IDPs telle que USrc.

De manière complémentaire, les LLS pourraient être également utilisés dans l'étude d'IDPs connues pour vérifier si ces protéines acquièrent une structure dans les cellules. Il serait intéressant par la suite d'étudier le domaine USrc en présence de mimes de la membrane plasmique



# **Chapitre IV**



## IV. Analyses RMN dans les cellules

### A. Généralités

Depuis quelques années la RMN dans les cellules ou RMN *in cell* connaît un fort développement. En effet, les pionniers de cette technique, Serber et Dotsch<sup>160</sup>, ont montré en 2001 qu'il existait des différences sur les spectres de protéines réalisés *in vitro* et ceux obtenus dans la cellule (Figure 117). Dans les études classiques, les protéines sont analysées dans un tampon adéquat, la concentration est optimisée de manière à obtenir des signaux détectables, si bien qu'elle est souvent beaucoup plus élevée que dans les cellules. La conformation d'une protéine exprimée dans une bactérie et étudiée *in vitro* peut-être différente de celle adoptée dans la cellule. Les interactions avec les différents partenaires potentiels de la cellule ne nous sont pas non plus accessibles *in vitro*. La RMN dans les cellules pourrait alors permettre d'avoir accès à ce type d'informations. La difficulté majeure à l'étude de protéines dans la cellule, outre la viscosité du milieu, est la faible concentration physiologique en biomolécules, rendant l'acquisition d'un spectre difficile.

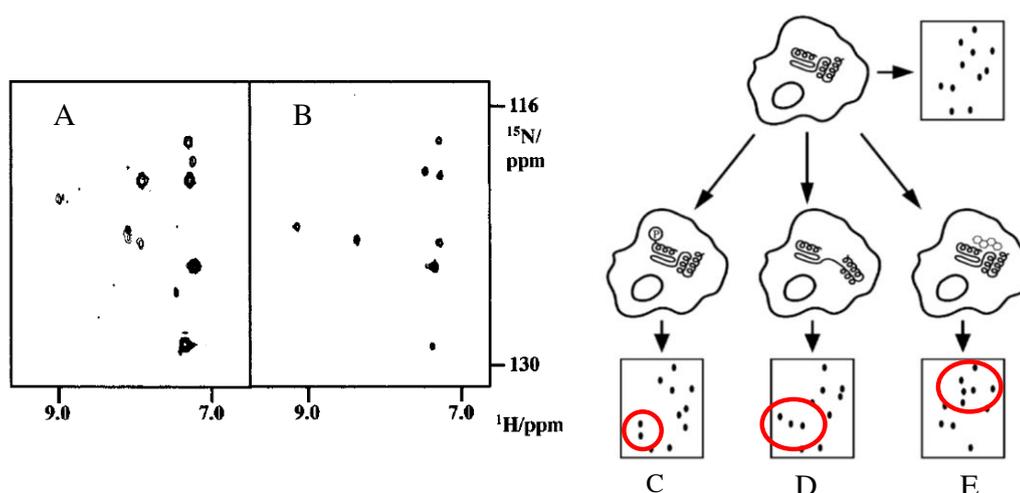


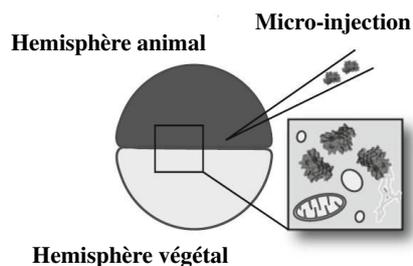
Figure 117 - Comparaison des analyses *in vitro* et *in cell*, issu de Serber et Dötsch<sup>160</sup>

A gauche, Analyse de la Calmoduline (A) *in cell*, (B) *in vitro*,

A droite, exemple potentiel d'application de la RMN *in cell* (C) Suivi de modifications post-traductionnelles (D)

Observation de changement de conformation (E) Observation des interactions et spectres RMN schématisés (bas).

Plusieurs techniques sont utilisées pour l'étude de protéines par RMN *in cell*. Une des plus connues est l'utilisation d'ocytes de *Xenopus Laevis*, qui sont des œufs de grenouille. Elles possèdent une taille relativement importante permettant d'insérer une protéine par micro-injection (Figure 118) et d'analyser la structure de la protéine dans ces cellules.



**Figure 118 - Micro-injection de protéine dans un oocyte de *Xenopus Laevis*<sup>230</sup>**

Une autre technique fréquemment utilisée est l'électroporation. C'est celle que nous avons décidé d'utiliser pour introduire les biomolécules étudiées dans les cellules issues de lignées cellulaires humaines HepG2 (cellules hépatocarcinomes) et de suivre ainsi son évolution à la fois par la microscopie à fluorescence et par RMN.

---

<sup>230</sup> Thongwichian & Selenko, « In-cell NMR in *Xenopus laevis* oocytes », *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.), vol. 895, 2012.

## B. Électroporation

### 1. Principes

L'électroporation permet d'insérer des composés exogènes ou endogènes dans les cellules, via l'ouverture des pores cellulaires par une décharge électrique. Cette impulsion électrique rend les lipides membranaires perméables de manière transitoire et réversible.

Pour réaliser cette manipulation, j'ai utilisé un appareil appelé Nucleofector™ Technology LONZA<sup>231</sup>. Celui-ci permet la transfection de l'ADN dans le noyau de la cellule. Il est adapté à de nombreux types cellulaires et notamment aux cellules HepG2. L'appareil est constitué d'une cellule amovible contenant deux électrodes. La capacité de cette cellule est de 100 µl (Figure 119).

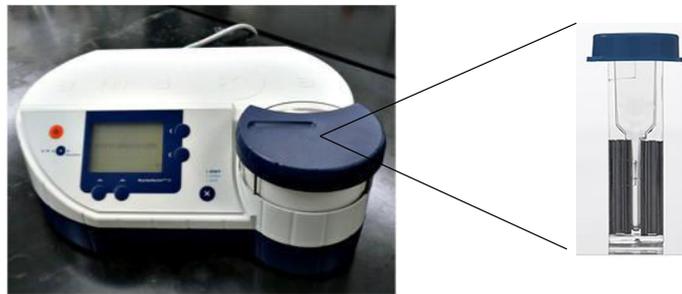


Figure 119 – Amaxa Nucleofector 2b<sup>232</sup>

L'appareil (à gauche) et la cellule d'électroporation (à droite)

Afin de réaliser l'électroporation sur des cellules HepG2, il est nécessaire d'avoir un culot sec d'un million de cellules environ. Ce culot est mis en suspension dans la solution d'électroporation (100 µl), fournie dans le kit Lonza®, et on ajoute ensuite le composé à électroporer. Le programme choisi est déjà prédéfini pour une haute viabilité des cellules. Après électroporation, il est nécessaire de neutraliser la solution avec 500 µl de milieu de culture. Nous pouvons ensuite effectuer les analyses souhaitées. Pour la microscopie, 30 µl sont prélevés et déposés sur une microplaque. Le reste de la solution est transférée dans un tube RMN, auquel on ajoute 10 % de D<sub>2</sub>O.

Le protocole détaillé est en annexe C.

<sup>231</sup> <http://www.lonza.com/products-services/bio-research/transfection/nucleofector-technology.aspx>

<sup>232</sup> <http://www.lonza.com/products-services/bio-research/transfection/nucleofector-devices/nucleofector-2b-device.aspx>

## 2. Les composés à électroporer

### a. I $\kappa$ B $\alpha$ et IKK $\beta$

Pour réaliser ces premiers tests, nous avons utilisé une partie de la protéine I $\kappa$ B $\alpha$  (dont la description est donnée dans le chapitre 2), 24 acides aminés, de K21 à D44 (Figure 120). Cette petite protéine contient les deux sérines responsables de son activité dans les réactions inflammatoires, *via* leur phosphorylation.



Figure 120 – Séquence de la protéine issue d'I $\kappa$ B $\alpha$

Mise en évidence de deux sérines (en jaune) qui peuvent être phosphorylées

Les deux sérines (en jaune sur la Figure 120) sont phosphorylées lors de la cascade de réponses cellulaires par la protéine IKK. Dans les cellules HepG2, nous avons analysé I $\kappa$ B $\alpha$  non phosphorylée et I $\kappa$ B $\alpha$  diphosphorylée :

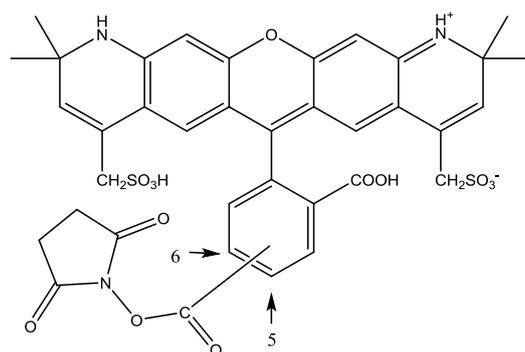
- dans un tampon phosphate,
- dans du lysat cellulaire,
- dans les cellules après électroporation.

Cette protéine appartient au complexe IKK. IKK $\beta$  est capable de phosphoryler les deux sérines d'I $\kappa$ B $\alpha$  (S12 et S16). Cette kinase est conservée dans une solution de glycérol, elle possède une masse molaire de 105 kDa. Cette enzyme sera utilisée afin de pouvoir observer par RMN de la phosphorylation d'I $\kappa$ B $\alpha$  dans les cellules.

Nous avons réalisé une étude préliminaire avec un fluorochrome, Alexa Fluor 568. Celui-ci possède une masse molaire plus faible que celle de notre petite protéine. Nous l'avons choisi car il est le témoin visuel de l'électroporation lors de l'observation par microscopie à fluorescence. Nous avons également analysé ce composé par RMN.

### b. Alexa Fluor 568

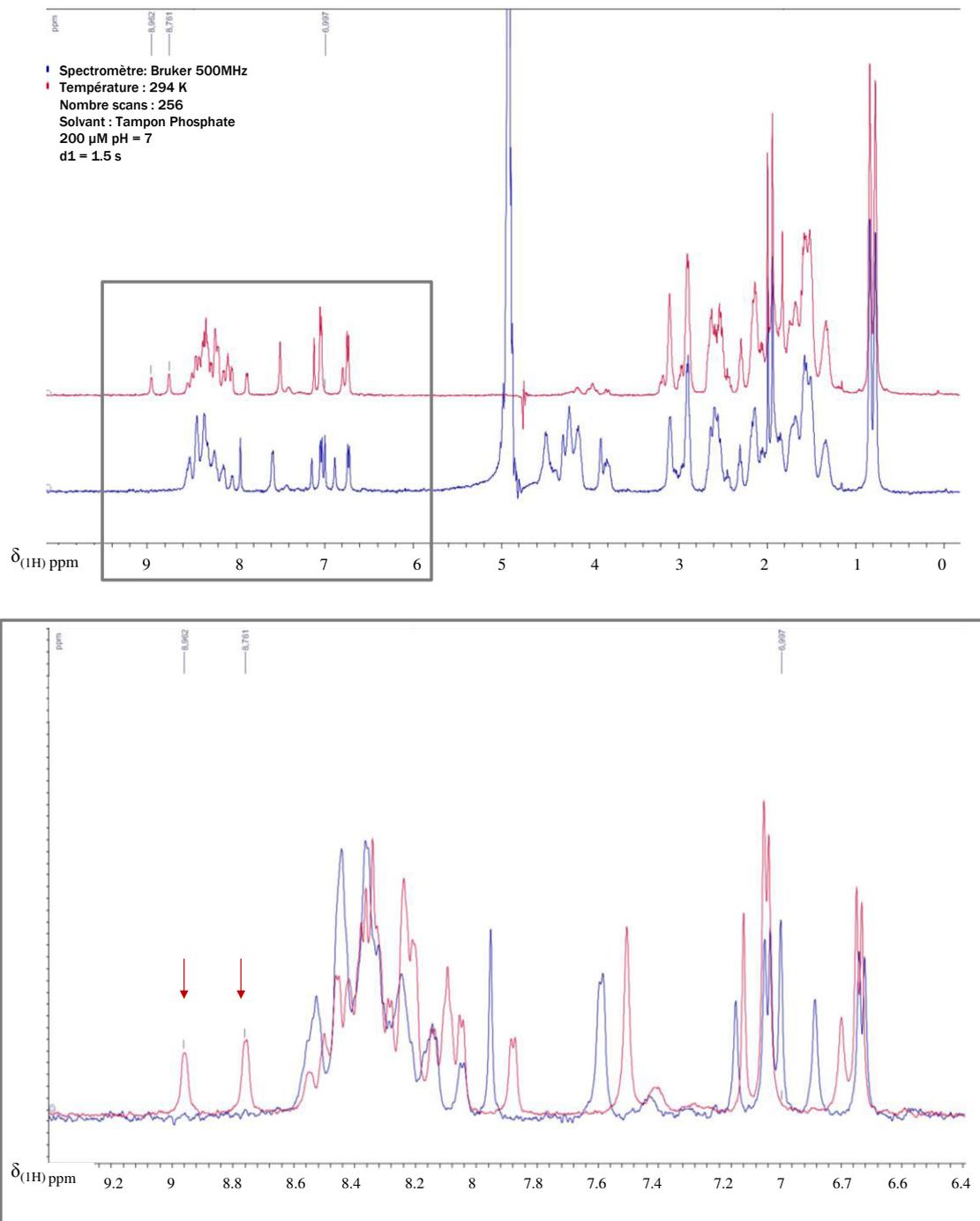
Alexa Fluor 568 est un composé  $M_w = 792 \text{ g.mol}^{-1}$  (Figure 121) qui a la propriété d'émettre de la fluorescence à 603 nm. Ce fluorochrome permet de marquer les cellules et d'observer sa fluorescence par microscopie.



**Figure 121 – Structure chimique d'Alexa Fluor 568**

### 3. Analyses d'I $\kappa$ B $\alpha$ en présence de lysats cellulaires

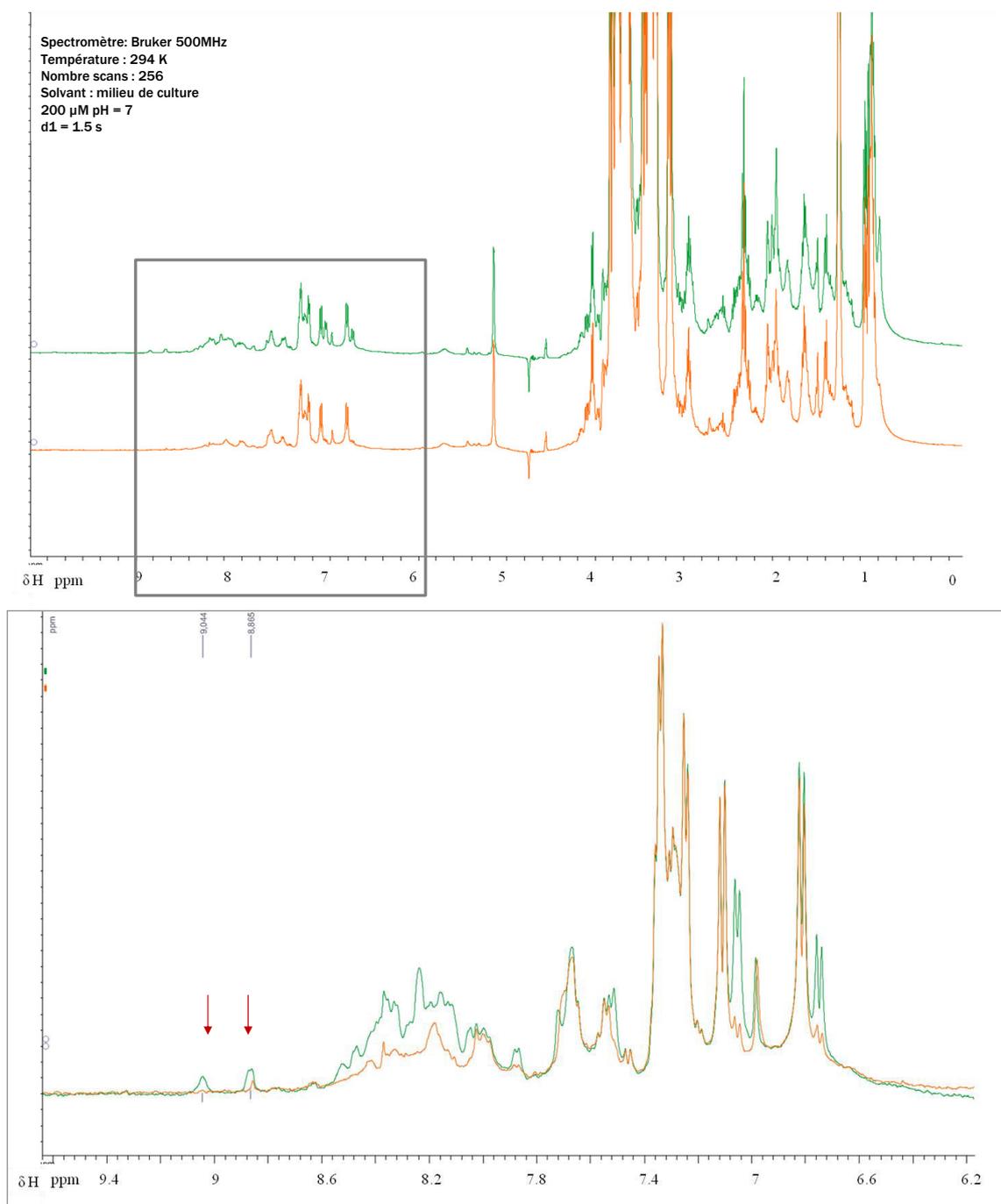
Dans un premier temps, nous avons acquis une première expérience RMN monodimensionnelle d'I $\kappa$ B $\alpha$  non phosphorylée et d'I $\kappa$ B $\alpha$  diphosphorylée dans un tampon phosphate afin d'avoir l'empreinte de ce composé (Figure 122). Chaque échantillon est préparé dans du tampon phosphate 50 mM à pH 7 et 10 % de D<sub>2</sub>O, pour un volume total de 500  $\mu$ l et une concentration de 200  $\mu$ M (pour l'échantillon de référence dans le tampon phosphate). Toutes les expériences ont été acquises à T = 300 K, pour une durée de 15 min par échantillon.



**Figure 122 – Spectre  $^1\text{H}$  d' $\text{IkBa}$  non phosphorylée (bleu) et  $\text{IkBa}$  diphosphorylée (rouge) dans du tampon phosphate (haut). Zoom sur la région comprise entre 6.4 et 9.4 ppm. Les flèches rouges indiquent les signaux correspondant aux  $\text{H}^{\text{N}}$  des sérines phosphorylées (bas)**

Sur ces spectres, on remarque deux signaux à **8,962 ppm** et **8,761 ppm** correspondant aux  $\text{H}^{\text{N}}$  des deux sérines phosphorylées. Ces deux signaux sont la cible principale des observations pour suivre la phosphorylation d' $\text{IkBa}$  dans les cellules.

Nous avons ensuite analysé les deux protéines d'I $\kappa$ B $\alpha$  dans le lysat cellulaire dans les mêmes conditions, **200  $\mu$ M** de protéine dans 500  $\mu$ l de milieu de culture en présence de cellules lysées (Figure 123).



**Figure 123 – Spectre proton d'I $\kappa$ B $\alpha$  non phosphorylée (orange) et I $\kappa$ B $\alpha$  diphosphorylée (vert) en présence de lysats cellulaires (haut). Zoom sur la région comprise entre 6.2 et 9.8 ppm. Les flèches rouges indiquent les signaux correspondant aux H<sup>N</sup> des sérines phosphorylées (bas).**

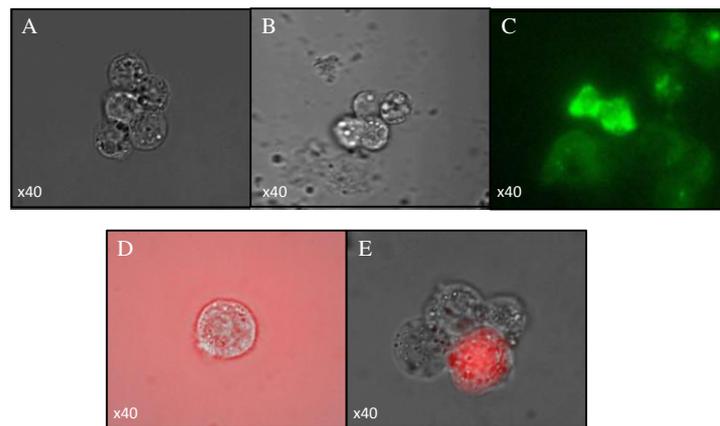
En présence de lysats cellulaires, les deux signaux distincts pour les deux sérines phosphorylées sont toujours présents pour I $\kappa$ B $\alpha$  diphosphorylée, **9,042 ppm** et **8,663 ppm** (spectre vert Figure 123). On remarque également qu'en présence de cellules, I $\kappa$ B $\alpha$  non phosphorylée (spectre orange Figure 123) n'est pas phosphorylée, même après 24h.

#### 4. La microscopie à fluorescence

La microscopie à fluorescence permet d'avoir un résultat imagé et concret de l'électroporation. On peut, en utilisant cette méthode, confirmer l'état sain des cellules après électroporation et la localisation du fluorochrome (Figure 124). Plusieurs expériences ont été réalisées :

- les cellules seules sans électroporation,
- les cellules seules avec électroporation,
- les cellules + GFP (*Green Fluorescent Protein*, ce composé est le positif de la transfection nucléaire) avec électroporation,
- les cellules + Alexa Fluor 568 sans électroporation,
- les cellules + Alexa Fluor 568 avec électroporation, ce composé est notre témoin d'intégration par cette technique.

La protéine issue d'I $\kappa$ B $\alpha$  n'est pas marquée par un composé fluorescent, et ne peut donc pas être observée par microscopie.



**Figure 124 – Observation des cellules HepG2 avec électroporation par Epiflu grossi 40 X**

**(A) Cellules sans électroporation ; (B) Cellules avec électroporation ; (C) Cellules + GFP avec électroporation (positif) ; (D) Cellules + Alexa Fluor 568 sans électroporation € Cellule + Alexa Fluor 568 avec électroporation**

En observant ces cinq photographies (Figure 124), on peut affirmer que :

- Les cellules ne subissent pas de dommages suite à l'électroporation, elles sont toujours vivantes et sphériques (Figure 124 A et 125 B).
- d'après l'image de l'électroporation avec la GFP, le programme utilisé est efficace et les composés sont capables de pénétrer dans la cellule (Figure 124 C).
- d'après les derniers tests effectués sur Alexa Fluor 568 (Figure 124 D et 125 E), en l'absence d'électroporation, Alexa Fluor 568 se situe à l'extérieur de la cellule et est accolé à la membrane plasmique, comme le montre le cercle rouge autour de la cellule observé sur la Figure 124 D alors

qu'en présence de cellules avec électroporation (Figure 124 E) et plusieurs rinçages au PBS, le fluorochrome est localisé à l'intérieur de la cellule.

Nous pouvons en conclure qu'un composé chimique est capable de pénétrer dans la cellule par électroporation dans les conditions que nous avons utilisées, ainsi que l'état sain des cellules après ce procédé.

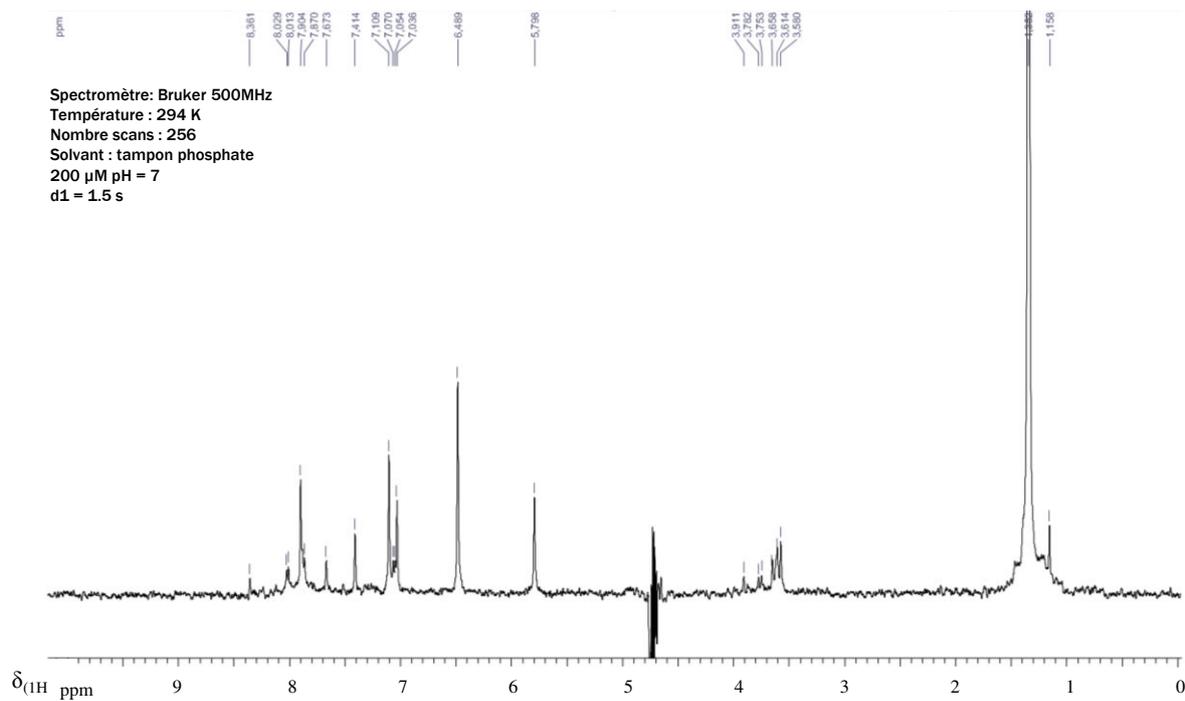
## 5. Analyses RMN

Nous souhaitons analyser d'une part, une petite protéine issue d'I $\kappa$ B $\alpha$  dont les sérines peuvent être phosphorylées par une kinase, IKK présente dans les cellules, et d'autre part, suivre cette phosphorylation par RMN. Nous avons vu précédemment que les images obtenues par microscopie à fluorescence montraient que le composé, Alexa Fluor 568, se trouvait à l'intérieur de la cellule après électroporation. Les observations de l'effet de l'électroporation sur Alexa Fluor 568 sont d'abord discutées, puis dans un second temps les résultats obtenus pour I $\kappa$ B $\alpha$  seront commentés.

Toutes les expériences ont été réalisées à 295 K après avoir ajouté 10 % de D<sub>2</sub>O (50  $\mu$ l environ).

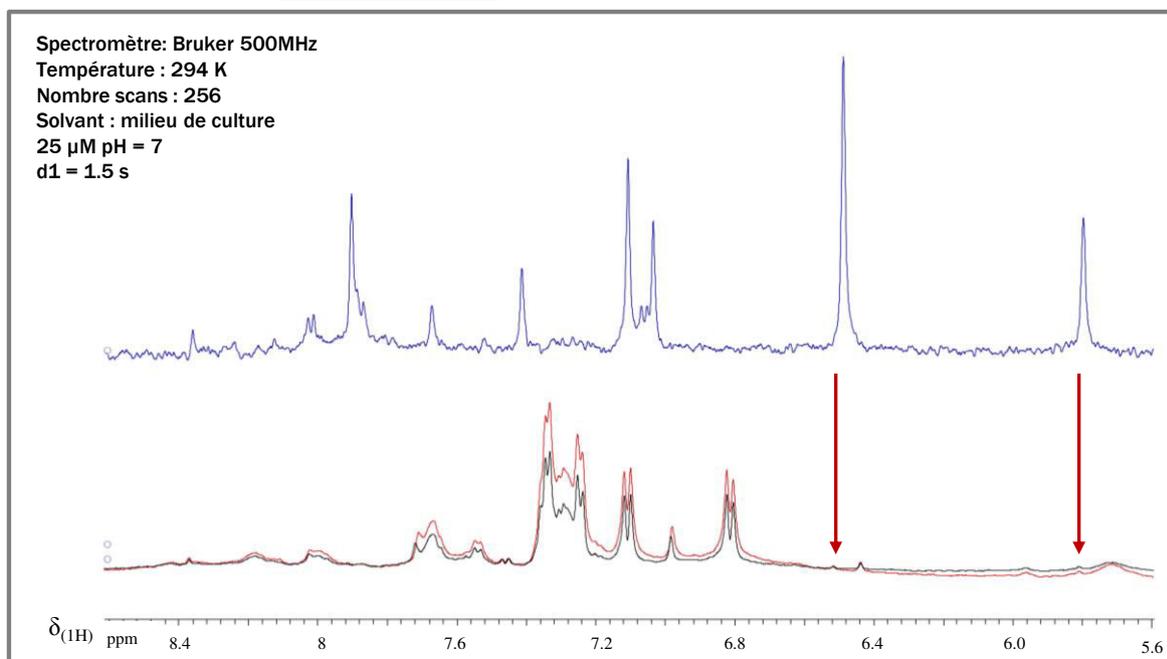
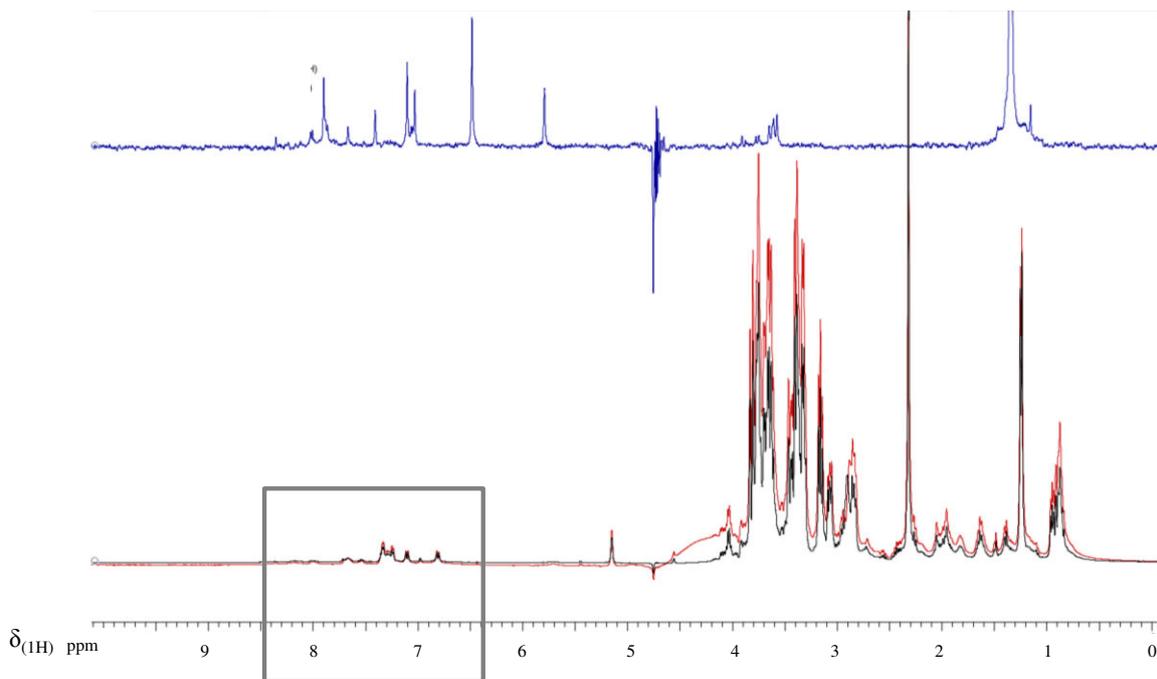
### a. Alexa Fluor 568

La première expérience réalisée est une 1D d'une solution d'Alexa Fluor 568 (200  $\mu$ M) dans du tampon phosphate pH = 7. Ce spectre (Figure 125) possède de nombreux signaux dont une majorité entre 5.5 ppm et 9 ppm. Cette gamme spectrale ( $\delta > 5$  ppm) est peu recouverte par le spectre des cellules HepG2, ces signaux pourront donc être la cible du suivi de modification après électroporation du composé.



**Figure 125 - Spectre d'Alexa Fluor 200  $\mu$ M dans du tampon phosphate 50 mM à 295 K**

Nous avons ensuite réalisé deux expériences similaires avec Alexa Fluor 568, l'une en présence de cellules HepG2 (1 million) dans du milieu de culture EMEM (500  $\mu$ l) et 100  $\mu$ l de produit d'électroporation, sans effectuer d'électroporation, et une seconde dans les mêmes conditions mais avec électroporation (voir le protocole décrit en Annexe C). Nous comparons les spectres obtenus (Figure 126), où le spectre noir correspond à l'expérience sur Alexa Fluor 568 en présence de cellules sans électroporation, le spectre rouge à des cellules + Alexa Fluor 568 avec électroporation et spectre bleu est l'expérience d'Alexa fluor 568 seul dans du tampon phosphate (présenté dans la Figure 125)

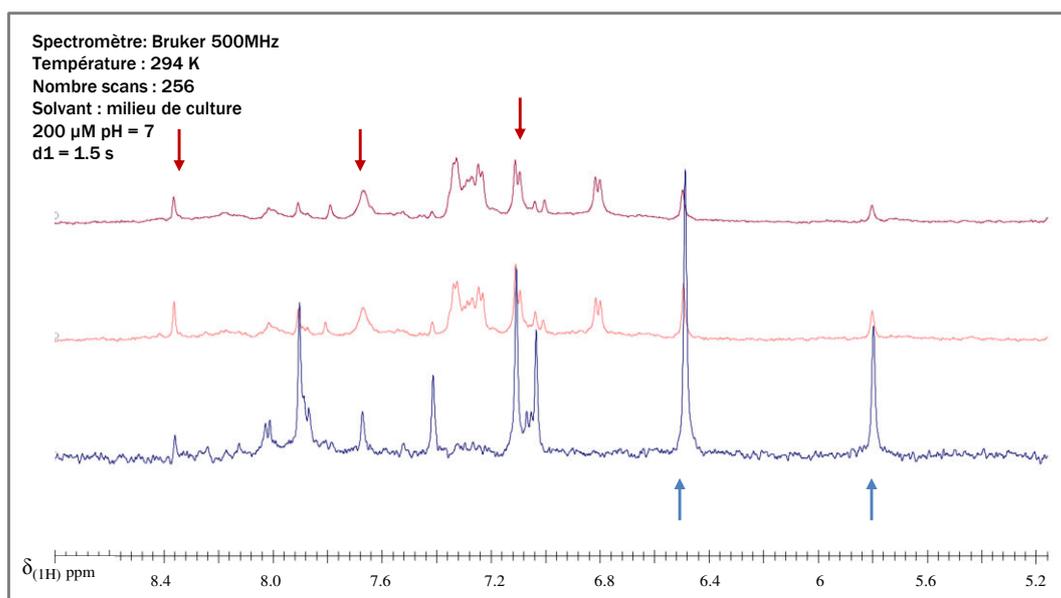


**Figure 126 – Spectre d’Alexa Fluor (200  $\mu$ M) dans du tampon phosphate 50 mM à 295 K (bleu), électroporé (25  $\mu$ M) dans les cellules (rouge) et sans électroporation (25  $\mu$ M) en présence de cellules (noir)**

A l’aide du zoom entre 5.5 ppm et 8.5 ppm (Figure 126 bas), nous observons une très faible différence entre le spectre rouge (Alexa Fluor 568 électroporé dans les cellules) et noir (Alexa Fluor 568 sans électroporation en présence de cellules). De plus, même s’il y a très peu de signaux cellulaires dans cette zone spectrale, la présence des cellules masque les signaux d’Alexa Fluor 568, notamment les deux pics distincts à 6.48 et 5.99 ppm, indiqués par les flèches rouges sur la Figure 126 bas. Il est nécessaire d’évaluer la quantité de composé à électroporer afin de pouvoir observer son empreinte

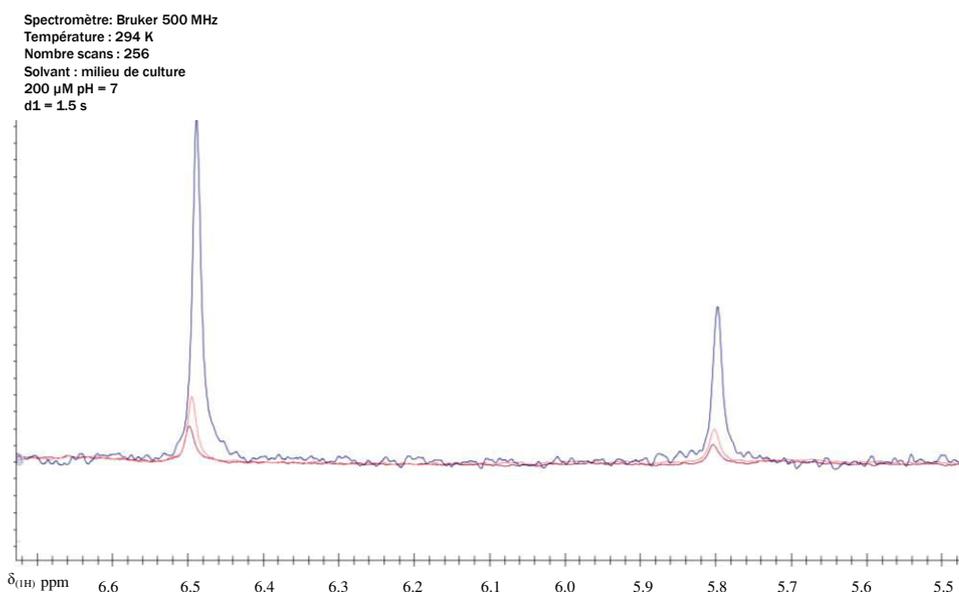
spectrale, ou de connaître la quantité maximale de milieu de culture à introduire sans masquer le signal d'Alexa Fluor 568.

Une dernière expérience avec ce composé a été réalisée : introduire progressivement une quantité connue (50  $\mu$ l) de lysat cellulaire (cellules lysées et milieu de culture EMEM) dans une solution d'Alexa Fluor 568 (200  $\mu$ M, 300  $\mu$ l) dans du tampon phosphate. Les différents spectres obtenus ont été superposés (Figure 127).



**Figure 127 – Evolution d'ajout de lysat cellulaire dans la solution d'Alexa Fluor dans le tampon phosphate V = 0  $\mu$ l (bleu) ajout de V = 100  $\mu$ l de lysat cellulaire (rose), ajout de V = 200  $\mu$ l de lysat cellulaire (rouge)**

En effectuant un zoom sur la zone spectrale d'intérêt, nous observons un élargissement des raies correspondant à Alexa Fluor 568 (flèches rouges sur Figure 127), dû à l'augmentation de la viscosité du milieu. On remarque également une diminution des raies à **5.8 ppm** et **6.5 ppm** (flèches bleu sur la Figure 127 et le zoom sur la Figure 128).



**Figure 128 - Zoom des spectres Alexa Fluor 568 avec ajout de lysat cellulaire dans le tampon phosphate V = 0  $\mu$ l (bleu) ajout de V = 100  $\mu$ l de lysat cellulaire (rose), ajout de V = 200  $\mu$ l de lysat cellulaire (rouge)**

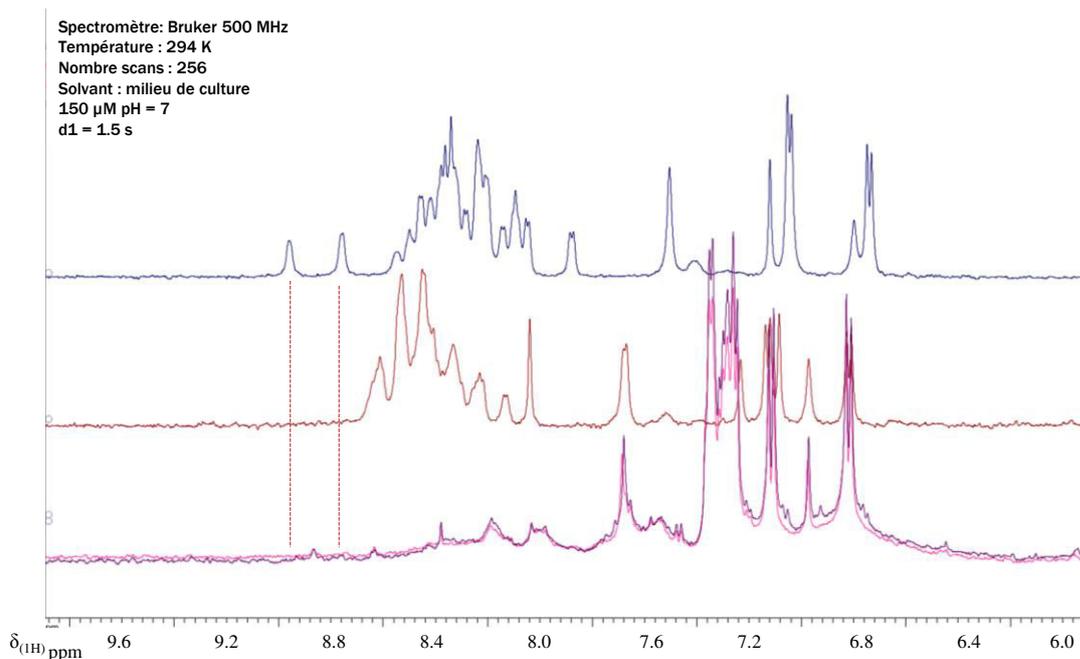
Afin de pouvoir observer ce composé en présence de cellules, pour une concentration de 200  $\mu$ M dans 500  $\mu$ l, on ne peut ajouter que 100  $\mu$ l maximum de milieu de culture (spectre rose Figure 128). Au-delà, l'élargissement est trop important. On pourrait également réaliser ces expériences avec une sonde beaucoup plus sensible, une cryosonde, qui n'a pas été utilisée pour ces études.

Nous avons réalisé des expériences similaires avec I $\kappa$ B $\alpha$  diphosphorylée et non phosphorylée.

### b. I $\kappa$ B $\alpha$

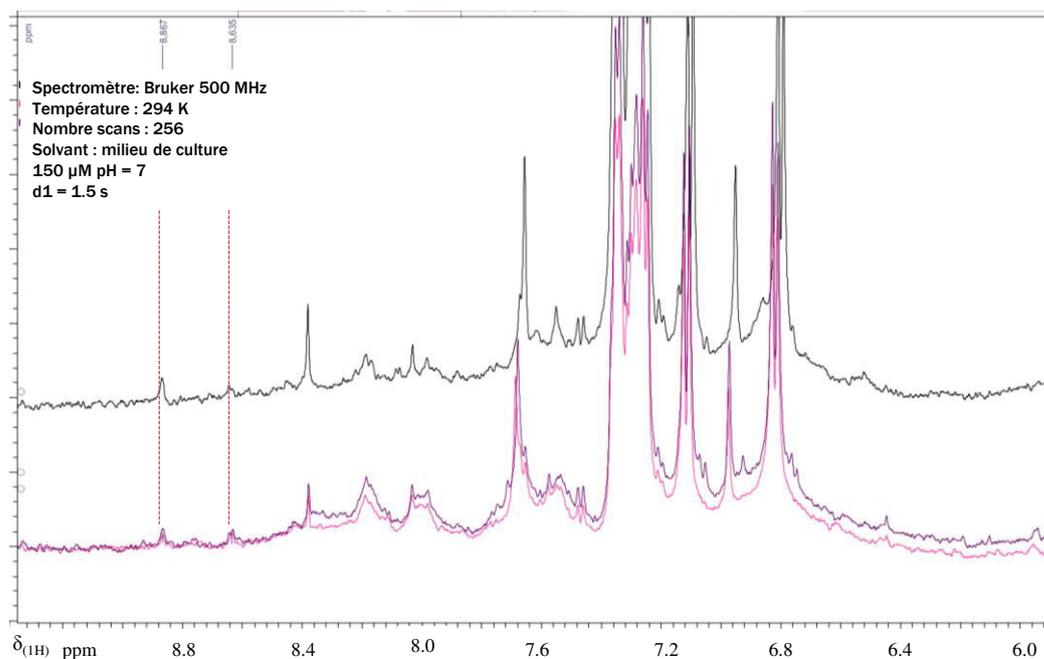
Dans la partie « *Analyses d'I $\kappa$ B $\alpha$  en présence de lysats cellulaires* », nous avons identifié deux signaux comme étant ceux des deux sérines phosphorylées d'I $\kappa$ B $\alpha$  à **8,962 ppm et 8,761 ppm** dans le tampon phosphate (Figure 122). Nous allons donc nous restreindre à chercher l'apparition de ces signaux lors de l'introduction d'I $\kappa$ B $\alpha$  dans la cellule.

Les spectres de chaque protéine (diphosphorylée et non phosphorylée) après électroporation sont similaires à ceux obtenus dans un tampon phosphate, avec des signaux correspondant aux protons amides très faible par rapport au reste du spectre (Figure 129). Cette première observation est toujours due à l'introduction dans un milieu visqueux. La concentration réelle d'I $\kappa$ B $\alpha$  est de **25  $\mu$ M** pour les deux protéines (non phosphorylée et diphosphorylée) pour toutes les expériences réalisées.



**Figure 129 - Zoom superposition des spectres d'I $\kappa$ B $\alpha$  - I $\kappa$ B $\alpha$  diphosphorylée dans du tampon phosphate (bleu), I $\kappa$ B $\alpha$  non phosphorylée dans du tampon phosphate (rouge), I $\kappa$ B $\alpha$  diphosphorylée électroporée dans les cellules (rose), I $\kappa$ B $\alpha$  non phosphorylée électroporée dans les cellules (violet)**

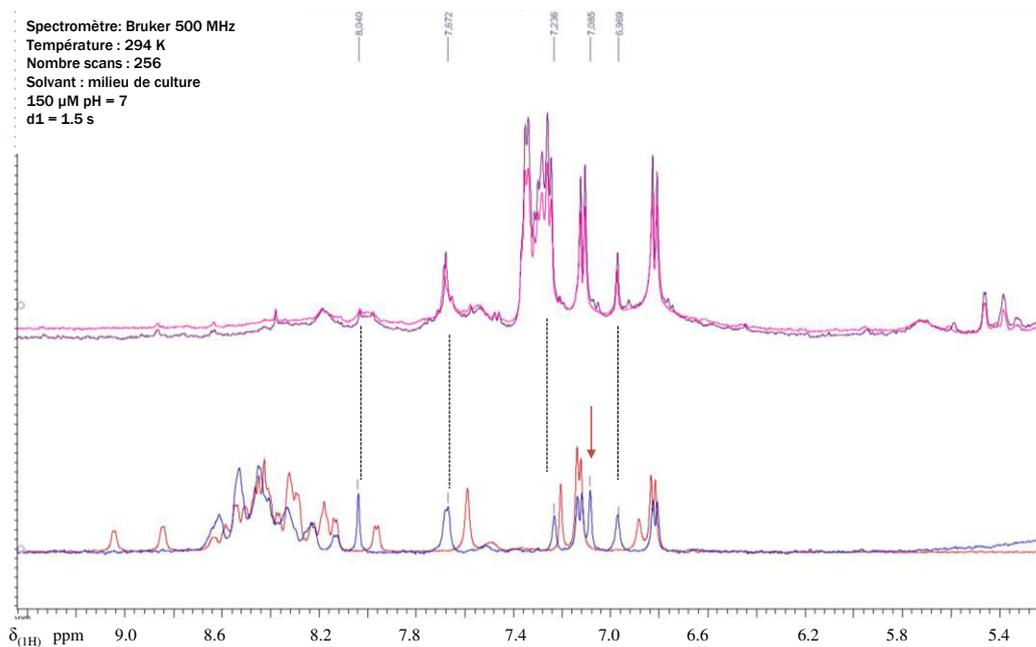
En réalisant un zoom sur le spectre entre 6 et 10 ppm nous observons deux pics (8.63 ppm et 8.86 ppm) à gauche du massif des protons amides sur les spectres bleu et rouge de la Figure 129. Ces deux signaux ne correspondent pas aux sérines comme le montre la Figure 130. Ils correspondent à deux pics de l'empreinte spectrale des cellules dans le milieu de culture.



**Figure 130 - Zoom de la superposition des spectres d'I $\kappa$ B $\alpha$  - I $\kappa$ B $\alpha$  diphosphorylée électroporée dans les cellules (rose), I $\kappa$ B $\alpha$  non phosphorylée électroporée dans les cellules (violet), milieu de culture seul en présence de cellules (noir)**

Nous avons également regardé si nous pouvions distinguer la phosphorylation d'I $\kappa$ B $\alpha$  par la présence, l'absence ou la modification de déplacement chimique de signaux autres que ceux des sérines (Figure 131).

En calibrant les spectres d'I $\kappa$ B $\alpha$  non phosphorylée et diphosphorylée sur le doublet de la leucine à 0.8 ppm (voir Annexe C) et à l'aide du zoom (Figure 131), nous remarquons qu'il y a un changement de déplacement chimique de certains protons aromatiques qui est dû à la présence des deux sérines phosphorylées (indiquer par le trait noir Figure 131). De plus, il existe un signal supplémentaire sur le spectre d'I $\kappa$ B $\alpha$  non phosphorylée à **7.08 ppm**. Malheureusement, tous ces signaux sont masqués par les signaux du milieu de culture entre 6.6 et 8.6 ppm (Figure 131).

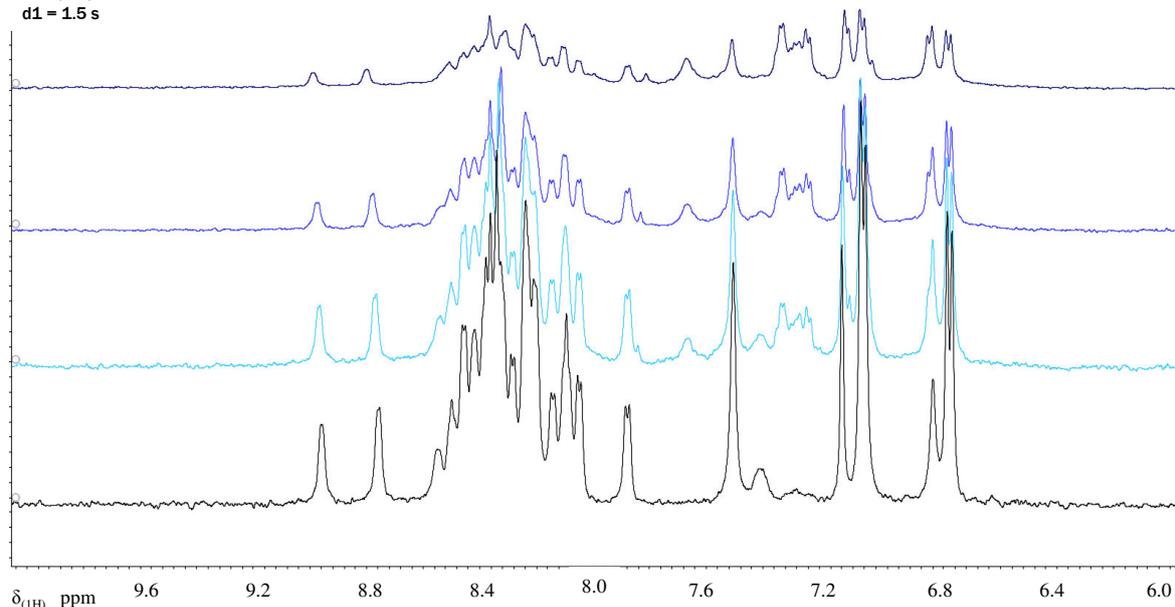


**Figure 131 - Zoom superposition des spectres d'I $\kappa$ B $\alpha$  électroporée ou non diphosphorylée dans du tampon phosphate (rouge), I $\kappa$ B $\alpha$  non phosphorylée dans du tampon phosphate (bleu), I $\kappa$ B $\alpha$  diphosphorylée électroporée dans les cellules (rose), I $\kappa$ B $\alpha$  non phosphorylée électroporée dans les cellules (violet)**

Il en découle qu'en introduisant la protéine I $\kappa$ B $\alpha$  non phosphorylée dans les cellules par électroporation, il n'y a pas de phosphorylation spontanée des sérines, il est donc nécessaire d'introduire en supplément la kinase IKK $\beta$ . Il est également possible que la faible concentration d'I $\kappa$ B $\alpha$  ne nous permette pas d'observer ces signaux.

Nous avons réalisé la même expérience que pour Alexa Fluor 568, à savoir ajouter progressivement (50  $\mu$ l) de lysat cellulaire dans une solution d'I $\kappa$ B $\alpha$  diphosphorylée (200  $\mu$ M, et de volume initial  $V_i$  = 300  $\mu$ l) dans du tampon phosphate (Figure 132).

Spectromètre: Bruker 500 MHz  
Température : 294 K  
Nombre scans : 256  
Solvant : milieu de culture  
150  $\mu$ M pH = 7  
d1 = 1.5 s



**Figure 132 – Effet de l’ajout progressif de lysat cellulaire dans une solution d’Ikb $\alpha$  diphosphorylée (200  $\mu$ M) zoom sur la région comprise entre 6 et 10 ppm (bas)**

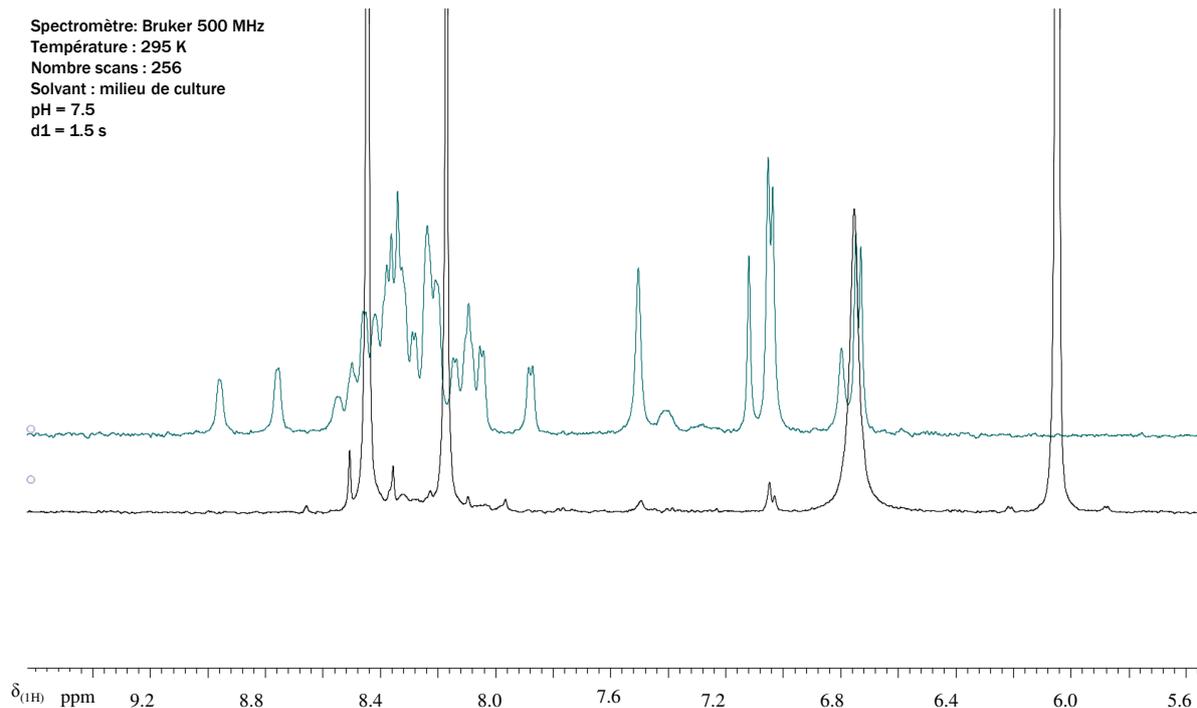
**de bas vers le haut : dans le tampon phosphate  $V_{(\text{lysate cellulaire})} = 0 \mu\text{l}$  (noir), ajout de  $V_{(\text{lysate cellulaire})} = 50 \mu\text{l}$  de lysat cellulaire (turquoise), ajout de  $V_{(\text{lysate cellulaire})} = 100 \mu\text{l}$  de lysat cellulaire (bleu), ajout de  $V_{(\text{lysate cellulaire})} = 200 \mu\text{l}$  de lysat cellulaire (bleu foncé)**

D’après la figure ci-dessus (Figure 132), la quantité adéquate de lysat cellulaire est de 1/10, soit 50  $\mu\text{l}$  pour 500  $\mu\text{l}$  de solution d’Ikb $\alpha$  à 200  $\mu\text{M}$ . Il serait nécessaire par la suite de réitérer les expériences en n’ajoutant que 50  $\mu\text{l}$  de lysat pour une concentration initiale d’Ikb $\alpha$  à 200  $\mu\text{M}$ .

Nous avons ensuite réalisé des expériences avec ajout de la kinase IKK $\beta$  afin de vérifier si nous ne pouvions pas phosphoryler les sérines d’Ikb $\alpha$ . Tous les spectres obtenus sont en annexe C.

La kinase est conservée dans du glycérol afin de préserver son activité. Le glycérol présente un signal très intense à 3.5 ppm masquant les signaux de la kinase. Il est nécessaire de changer le solvant de l’enzyme avant utilisation. Nous avons réalisé des expériences avec cette kinase en l’introduisant dans une solution d’Ikb $\alpha$  (200  $\mu\text{M}$ , 500  $\mu\text{l}$ ) dans du tampon phosphate. Dans ces conditions, (présence de glycérol) les signaux correspondant au H<sup>N</sup> des sérines phosphorylées ne sont pas présents sur le spectre d’Ikb $\alpha$ , soit la kinase n’a pu phosphoryler la protéine, soit nous ne sommes pas assez sensible.

Nous avons réalisé une dernière expérience avec la protéine issue d’Ikb $\alpha$  non phosphorylée introduite dans du lysat cellulaire, à laquelle sont ajoutés la kinase IKK $\beta$  ainsi que les adjuvants nécessaires lors de la réaction de phosphorylation, de l’ATP et du Mg<sup>2+</sup> (Figure 133).



Quand nous comparons cette expérience avec le spectre de référence d'IκBα diphosphorylée, nous remarquons l'absence des deux signaux des sérines. Il existe plusieurs explications possibles, soit la kinase ajoutée n'est pas efficace dans ces conditions, soit la kinase n'a pas été introduite en quantité suffisante ou bien nous ne sommes pas assez sensibles sans cryosonde.

## 6. Conclusion

Ces expériences d'électroporation sont des essais préliminaires. La spectroscopie à fluorescence a montré que le composé Alexa fluor 568 ne peut rentrer pas dans la cellule sans électroporation. En RMN, l'analyse dans ces conditions utilisant une sonde non cryogénique, ne permet pas d'obtenir une sensibilité suffisante pour détecter la pénétration du composé Alexa Fluor 568 dans la cellule. En effet, la présence de milieu de culture (le sérum de veau fœtal principalement) masque les signaux d'intérêt à la fois par recouvrement des signaux, mais surtout par le rapport des intensités. Les signaux des composés cellulaires sont intenses et couvrent ceux des composés d'intérêt.

La protéine IκBα n'étant pas observable par microscopie à fluorescence, nous n'avons réalisé qu'un suivi par RMN. Cette protéine possède deux sérines phosphorylables par la kinase IKKβ dont les signaux sont identifiés et séparés du massif de protons amides. Le suivi de phosphorylation s'est focalisé sur les deux signaux à 8.8 et 8.9 ppm. Nous avons vu que, dans les cellules HepG2, soit la

phosphorylation ne peut avoir pas lieu, soit nous ne disposons pas de la sensibilité nécessaire à sa détection.

Lors de l'ajout progressif de lysat cellulaire nous avons vu que pour une concentration de 200  $\mu\text{M}$  de protéine, il est nécessaire d'avoir un minimum de milieu de culture. Il conviendrait d'effectuer ces expériences d'électroporation avec une concentration plus importante de protéine, de l'ordre de 0.1 mM et de neutraliser la solution d'électroporation avec du PBS au lieu du milieu de culture.

Lors de l'ajout de la kinase  $\text{IKK}\beta$ , le glycérol présent dans la solution de conservation masque les signaux d' $\text{IKK}\beta$  et de notre protéine  $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ . Il serait nécessaire de changer la solution au préalable, c'est-à-dire, avant la manipulation de la phosphorylation d' $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ .

## C. Polarisation Dynamique Nucléaire (DNP)

### 1. Introduction

La DNP est un outil qui peut pallier au problème majeur rencontré en RMN : la sensibilité. La dissolution-DNP permet d'accroître le rapport S/B, et donc la sensibilité de l'analyse RMN en augmentant la polarisation des noyaux *via* le transfert de polarisation des électrons aux noyaux. L'acquisition par DNP est rapide et permet de suivre en temps réel la transformation de métabolites, mais c'est également un inconvénient car l'acquisition du signal est limitée par la constante de temps de relaxation longitudinale  $T_1$ .

Notre appareil DNP est une construction faite maison, il a donc fallu optimiser les différents paramètres pour obtenir une polarisation efficace à l'état solide et minimiser la perte de polarisation pendant le transfert de la solution hyperpolarisée au spectromètre d'acquisition.

Dans ce chapitre, sont présentés les résultats préliminaires sur l'étude de la conversion pyruvate - lactate catalysée par la *lactate déshydrogénase (LDH)* en présence de divers types cellulaires d'origine murine avec ajout de la coenzyme NADH nécessaire à la réaction enzymatique (Figure 134).

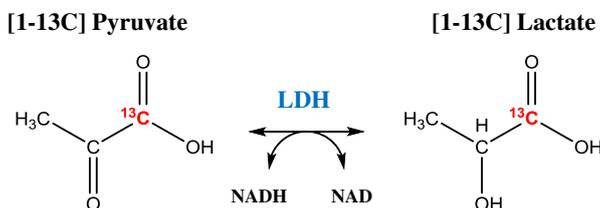


Figure 134 – Conversion Pyruvate-Lactate

Nous avons choisi d'analyser le [1-<sup>13</sup>C] pyruvate car la relaxation longitudinale du <sup>13</sup>C est  $T_1 > 50$  s lors de l'étude à haut champ et à une température de 293 K. A l'aide de la dissolution-DNP, nous pouvons suivre la réduction du pyruvate par LDH<sup>233, 16</sup> Il a été montré qu'en présence de cellules, la transformation du pyruvate en lactate par la LDH est détectée sur une échelle de l'ordre de la minute<sup>234</sup>.

<sup>233</sup> Harrison et al., « Comparison of kinetic models for analysis of pyruvate-to-lactate exchange by hyperpolarized <sup>13</sup>C NMR », NMR in biomedicine, vol. 25, no 11, novembre 2012.

<sup>234</sup> Tayler et al., « Direct enhancement of nuclear singlet order by dynamic nuclear polarization », Journal of the American Chemical Society, vol. 134, no 18, 9 mai 2012.

## 2. Etude de la conversion du pyruvate-lactate

Une étude préliminaire a été d'observer la conversion pyruvate-lactate *in vitro* en présence de la LDH et de son co-facteur le NADH. La solution du pyruvate à polariser est composée de 300  $\mu\text{l}$  de 1.12 M Pyruvate, 33 mM de TEMPOL dilué dans 1 : 2 d $_6$ -Ethanol : D $_2$ O. Cette solution est polarisée à 3.35 T et est maintenue sous des irradiations micro-ondes de 94.2 GHz pendant 90 min. Puis, le pyruvate polarisé est dissout dans 5 ml D $_2$ O avant d'être injecté (500  $\mu\text{l}$ ) dans le tampon contenant la LDH. Cette injection est réalisée *via* un capillaire qui déverse la solution polarisée directement dans le tube RMN contenant 500  $\mu\text{l}$  de tampon, ce tube étant déjà préalablement introduit dans le spectromètre d'analyse (500 MHz). Le protocole détaillé sera présenté dans la partie « *Hyperpolarisation* » de ce chapitre.

La Figure 135 montre le signal hyperpolarisé du pyruvate (ligne continue sur la Figure 135) obtenu par la DNP en comparaison avec la même solution sans polarisation (pointillés sur la Figure 135). Nous obtenons dans ces conditions en solution tampon une meilleure sensibilité du signal du [1- $^{13}\text{C}$ ]-pyruvate à 170 ppm. La durée de vie  $T_1$  de cette polarisation est de 75 s dans de l'eau (graphe en haut à droite de la Figure 135).

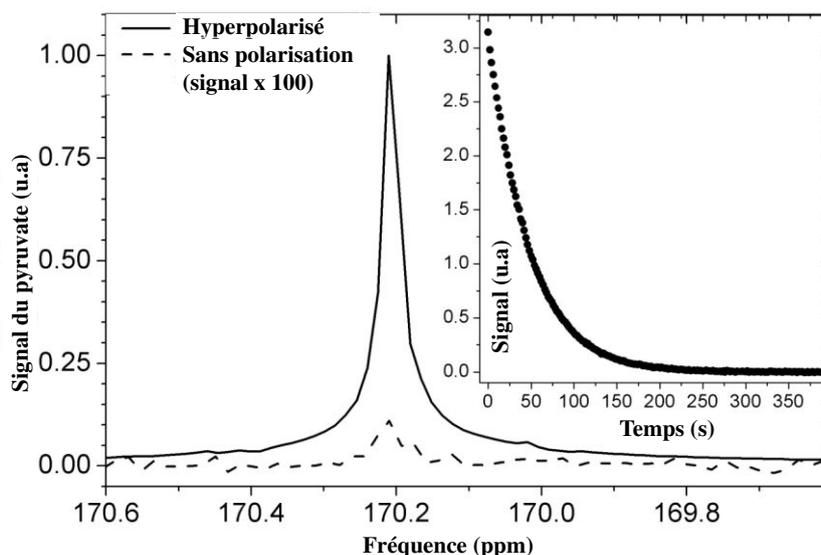


Figure 135 – Signal du [1- $^{13}\text{C}$ ]-pyruvate hyperpolarisé (ligne continue) et non polarisé (pointillés)

Lors de l'ajout de la solution polarisée dans la solution tampon contenant la LDH et 0.3 mM de NADH, nous obtenons un signal de lactate (Figure 136) qui est dépendant de la concentration de la LDH.

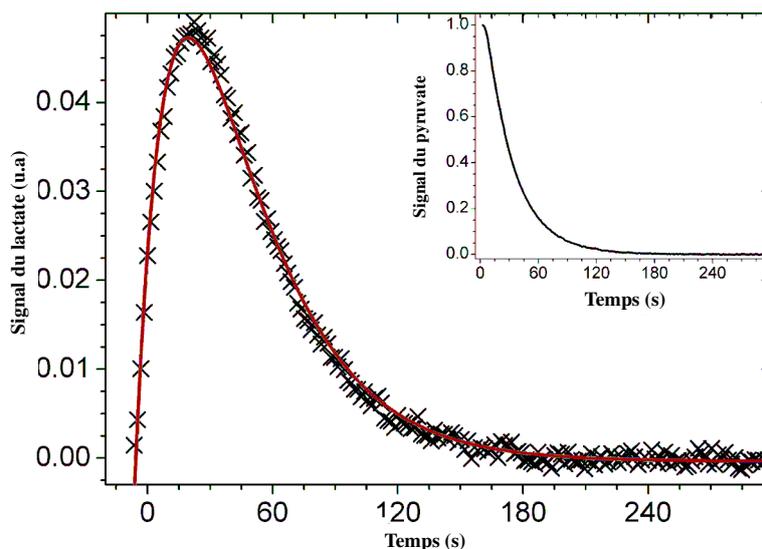
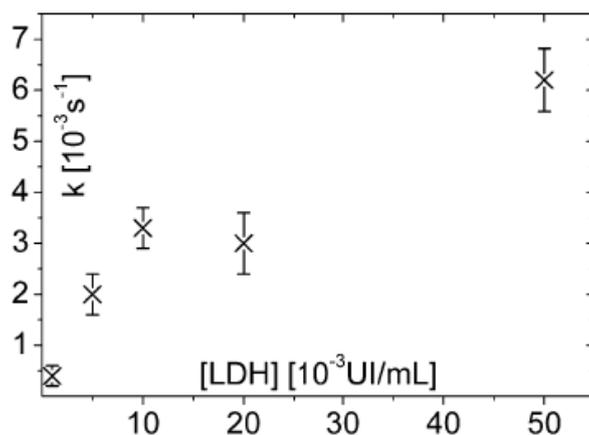


Figure 136 - Evolution du temps de vie  $T_I$  de l'aimantation du lactate dans une solution tampon contenant de la LDH et 0.3 mM de NADH

Nous avons réalisé une succession d'expériences en faisant varier la concentration de LDH (Figure 137).



[LDH] $10^{-3}$ UI/ml	$k_{eff}$ ( $s^{-1}$ )	$T_{I(lactate)}$ (s)	$T_{I(pyruvate)}$ (s)
50	$6.2 \pm 0.5 \cdot 10^{-3}$	$22.5 \pm 3$	$65.4 \pm 6$
20	$3.0 \pm 0.6 \cdot 10^{-3}$	$23.4 \pm 3$	$50.4 \pm 6$
10	$3.3 \pm 0.2 \cdot 10^{-3}$	$21.2 \pm 3$	$56.8 \pm 6$
5	$2.0 \pm 0.2 \cdot 10^{-3}$	$28.3 \pm 3$	$59.8 \pm 6$
1	$0.38 \pm 0.2 \cdot 10^{-3}$	$22.9 \pm 3$	$57.7 \pm 6$

Figure 137 – Valeurs du temps de relaxation  $T_I$  et la constante de conversion apparente  $k_{eff}$  en fonction de la concentration de la LDH

En effet, comme le montre le tableau de la Figure 137 la concentration en LDH est directement liée à la constante de conversion  $k_{eff}$  (graphe sur la Figure 137).

Cette constante se détermine à partir de deux équations :

$$\frac{dM_{pyr}}{t} = -R_{pyr} \times M_{pyr}(t) - k_{eff} \times M_{pyr}(t) \quad (C2.1)$$

$$\frac{dM_{lac}}{t} = -R_{lac} \times M_{lac}(t) + k_{eff} \times M_{lac}(t) \quad (C2.2)$$

avec  $R_{pyr}$  et  $R_{lac}$  sont respectivement les taux de relaxation du pyruvate et du lactate,  $M_{pyr}$  et  $M_{lac}$  sont les aimantations respectives du pyruvate et du lactate et  $k_{eff}$  qui est la constante de cinétique apparente de la réaction.

On remarque que dans ces conditions le temps de vie  $T_1$  est plus long que le  $T_1$  du lactate d'un facteur deux.

### 3. Les cellules murines et les échantillons

Les cellules CCL39 (cellules fibroblastes de poumons de hamsters) sont utilisées lors des expériences DNP avec le pyruvate<sup>235</sup>. Deux lignées ont été testées :

- les cellules **MTC4<sup>+</sup>** : le gène du récepteur humain MTC4 a été incorporé

Les récepteurs MTC 4 sont des *transporteurs monocarboxylate 4* et ont une constante de Michaelis plus élevée que les autres récepteurs,  $Km_{(lactate)} = 29$  mM et  $Km_{(pyruvate)} = 150$  mM (déterminées dans des oocytes de grenouilles)<sup>236</sup> permettant l'accumulation de ces espèces dans la cellule. La constante enzymatique de la réduction de lactate en pyruvate étant élevée, celui-ci se fait aisément réduire en lactate.

- les cellules dites **Res<sup>-</sup>** : knock out de la chaîne respiratoire. Cette lignée est moins apte à transformer le pyruvate en lactate ;

Nous récupérons les cellules en suspension dans leur milieu de culture, (8 millions de cellules dans 1 ml). Pour la préparation de l'échantillon à analyser, nous prélevons 480  $\mu$ l de ces cellules en suspension dans lesquels nous ajoutons 20  $\mu$ l d'une solution de lactate (33 mM) préalablement préparée dans un solvant (2 : 1) D<sub>2</sub>O / d<sub>6</sub>-Ethanol. Nous ajoutons également 50  $\mu$ l de tampon NADH (0.3 mM) nécessaire pour la conversion du pyruvate. Cet échantillon est introduit dans un tube RMN 5 mm. Ce dernier est surmonté d'un capillaire en PTFE de 2 mm de diamètre qui permettra l'injection de la solution polarisée sans avoir à sortir le tube du spectromètre d'acquisition.

La solution à hyperpolariser est constituée de 1.12 M [1-<sup>13</sup>C]-pyruvate (Sigma Aldrich), 33 mM TEMPOL (Sigma Aldrich) dilués dans un mélange D<sub>2</sub>O / d<sub>6</sub>-Ethanol (2 : 1). La quantité de radicaux est importante pour la polarisation. Le porte-échantillon peut contenir un maximum de 500

<sup>235</sup> Collaboration avec l'équipe de B. Tavitian de l'Hôpital Georges Pompidou UMR\_S 970 INSERM

<sup>236</sup> Halestrap, « The monocarboxylate transporter family--Structure and functional characterization », IUBMB life, vol. 64, no 1, janvier 2012.

$\mu\text{l}$ , nous polarisons 300  $\mu\text{l}$  de la solution de  $[1-^{13}\text{C}]$ -pyruvate, ce qui est suffisant pour voir l'évolution de l'aimantation du pyruvate.

#### 4. Hyperpolarisation

L'échantillon à hyperpolariser (pyruvate) est introduit dans le porte-échantillon, puis est plongé 5 min dans l'azote liquide afin de le pré-congeler. Après cette étape, il faut rapidement l'introduire dans le cryostat avant qu'il ne se réchauffe (en moins de 30 s). Ensuite, il faut refroidir tout le dewar de l'hyperpolariseur par l'arrivée de l'hélium basse pression jusqu'à une température de 1 K. La source micro-onde est activée à  $\nu_{\text{mw}} = 94.2$  GHz, et la polarisation est effectuée pendant 90 min.

A la fin de la polarisation, on effectue la dissolution de l'échantillon par 5 ml de  $\text{D}_2\text{O}$ . Pour cela, on introduit la solution de  $\text{D}_2\text{O}$  dans le système de dissolution qui permettra de la pressuriser et de la chauffer jusqu'à une température  $T = 180 - 200^\circ\text{C}$ . Le système de dissolution est introduit fermement dans l'hyperpolariseur jusqu'au porte-échantillon. L'échantillon polarisé est dissout et sort de l'hyperpolariseur par un capillaire en PTFE pour être directement récupéré dans un bécher. Il faut ensuite rapidement prélever 500  $\mu\text{l}$  à l'aide d'une seringue et l'injecter dans le tube situé dans le spectromètre d'acquisition *via* le capillaire.

#### 5. Analyse RMN

Après la dissolution, l'expérience RMN est lancée. Celle-ci comporte une succession de séquences utilisant des impulsions d'excitation de  $10^\circ$  et d'acquisition espacés de 1.5 s (Figure 138) afin de suivre la progression de l'aimantation du pyruvate (substrat) et du lactate (produit).

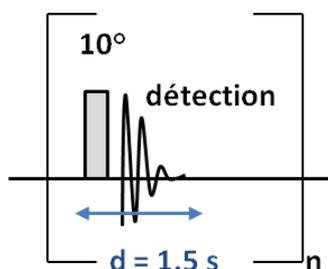


Figure 138- Séquence d'impulsions  $^{13}\text{C}$  pour l'analyse DNP

Nous avons réalisé deux expériences la première avec la lignée cellulaire MTC 4<sup>+</sup> et la seconde avec la lignée cellulaire Res<sup>-</sup> (knock out).

Le spectre obtenu est une 2D dont la première dimension correspond au déplacement chimique du  $^{13}\text{C}$  et la seconde au temps d'acquisition (Figure 139).

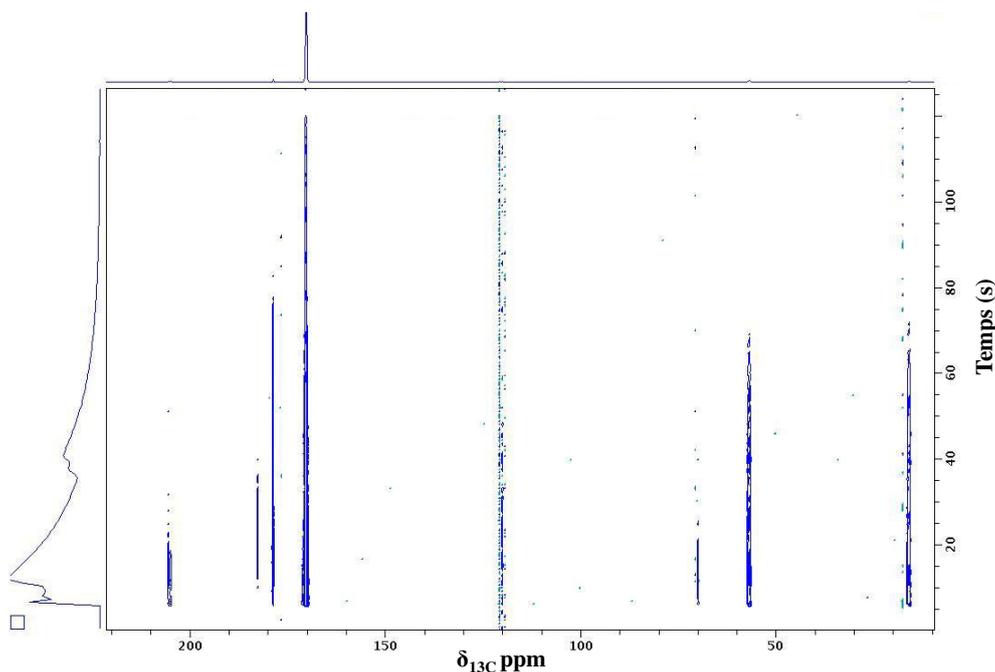


Figure 139 – Spectre 2D suivi de l'aimantation du pyruvate et du lactate sur les cellules MTC 4<sup>+</sup>

Lorsqu'on regarde un spectre 1D issu de ce spectre Figure 139, on observe plusieurs signaux identifiables (Figure 140) :

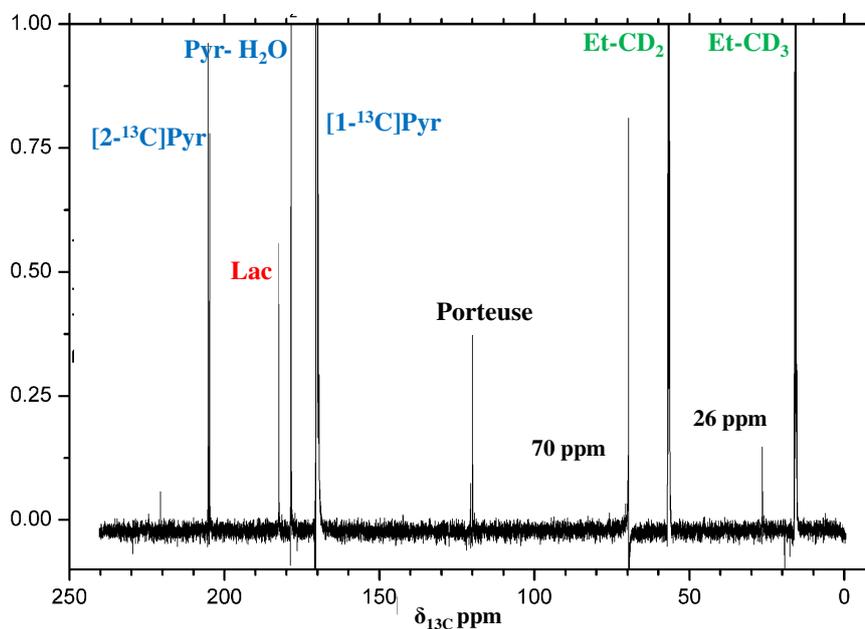


Figure 140 – Spectre 1D  $^{13}\text{C}$  du suivi de la conversion pyruvate – lactate avec Pyr- $\text{H}_2\text{O}$  : pyruvate hydraté,  $[1-^{13}\text{C}]$  Pyr : pyruvate marqué sur le carbone 1,  $[2-^{13}\text{C}]$  Pyr : pyruvate marqué sur le carbone 2, Et- $\text{CD}_2$  et Et- $\text{CD}_3$  : éthanol deutéré, Lac : lactate

Ils correspondent aux composés (Figure 140) :

- **Pyruvate** 205 ppm ; 178 ppm et 170 ppm

- **Lactate** 182 ppm
- **Solvant éthanol-deutééré** : 57 ppm et 16 ppm
- **Les signaux à 70 et 26 ppm** ne sont pas encore identifiés pour le moment, ils correspondent certainement au  $[2-^{13}\text{C}]$ -lactate (70 ppm) et le méthyle du pyruvate (26 ppm).

La durée de vie des différents signaux a ensuite été analysée. Le  $^{13}\text{C}$  du groupement acide du pyruvate possède un temps de vie  $T_{1\text{pyr}} = 36.3\text{ s}$  tandis que celui du lactate est de  $T_{1\text{lactate}} = 60.2\text{ s}$  (Figure 141).

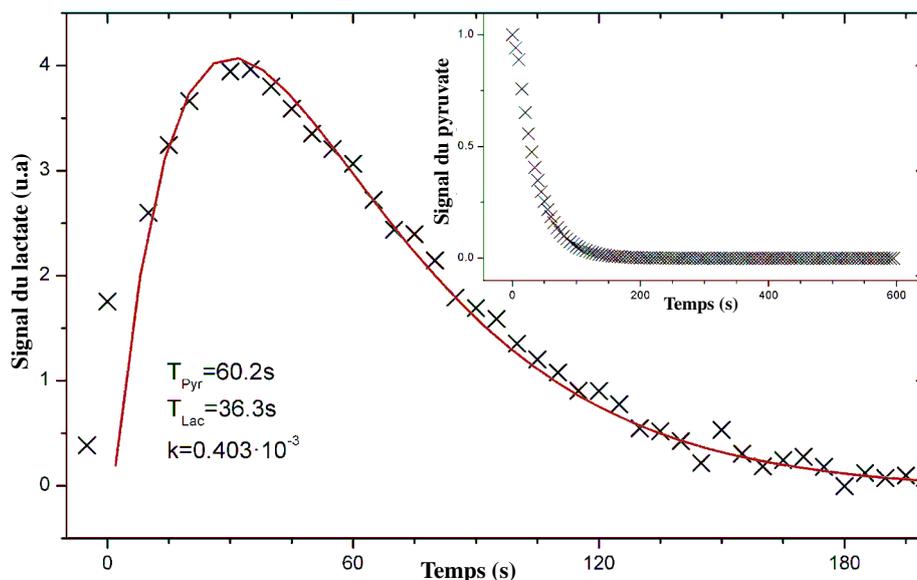
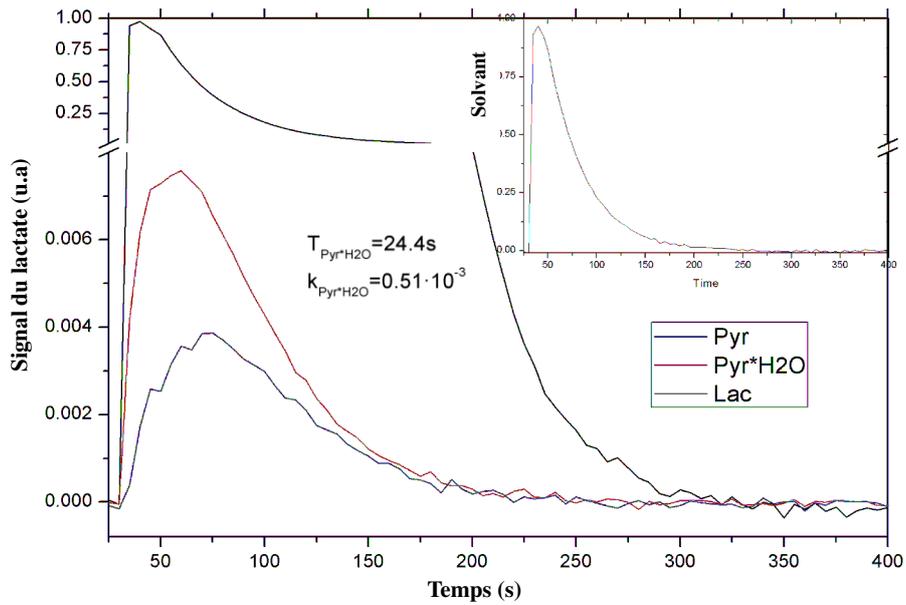


Figure 141 – Evolution du temps de vie de l'aimantation du lactate

La valeur de la constante de conversion effective du pyruvate et de ses produits hydratés en lactate a été également déterminée à partir des équations présentées précédemment (C2.1 et C2.2).

Nous obtenons une valeur de constante de conversion effective pour le lactate  $k_{\text{lac}} = 0.403 \times 10^{-3}\text{ s}^{-1}$ .

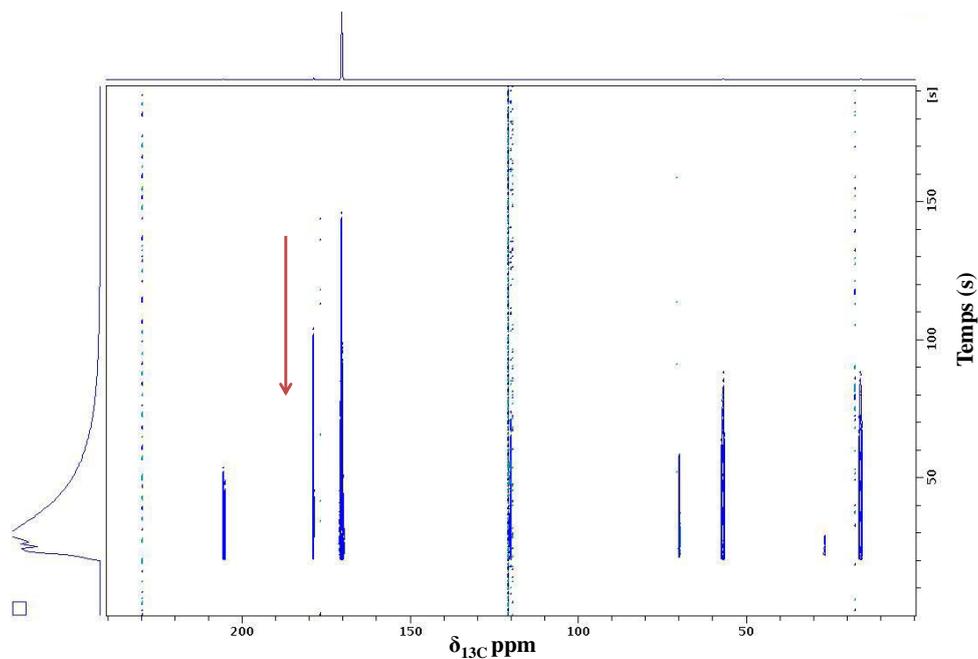
Le pyruvate hydraté (Pyr- $\text{H}_2\text{O}$ ) est le sous-produit majoritaire de la réaction, le carbone de son groupement acide possède un temps de vie de  $T_{1\text{pyr hydraté}} = 24.4\text{ s}$  (Figure 142) et sa constante de conversion effective est de  $k_{\text{pyr-H}_2\text{O}} = 0.500 \times 10^{-3}\text{ s}^{-1}$ .



**Figure 142 – Evolution du substrat et deux des métabolites**  
**Le lactate en bleu, le pyruvate en noir et le pyruvate hydraté en rouge.**

Dans cette expérience, il est possible de suivre le transfert de l'aimantation du pyruvate polarisé en lactate et de suivre également l'évolution de son aimantation. Afin de s'assurer qu'il s'agisse de la conversion du pyruvate en lactate par la LDH présente dans les cellules, nous avons utilisé une autre lignée cellulaire, les Res<sup>-</sup> en procédant de la même manière décrite dans le protocole cité précédemment.

On remarque que le signal du lactate sur le spectre 2D manque (flèche rouge sur la Figure 143).



**Figure 143 - Spectre 2D suivi de l'aimantation du pyruvate et du lactate avec les cellules Res<sup>-</sup>**

On obtient des durées de vie pour le pyruvate de  $T_{1\text{Pyr}} = 52\text{ s}$  et pour le pyruvate hydraté  $T_{1\text{Pyr hydraté}} = 23\text{ s}$  et une constante de conversion effective  $k_{\text{pyr-H}_2\text{O}} = 1 \times 10^{-3}\text{ s}^{-1}$ .

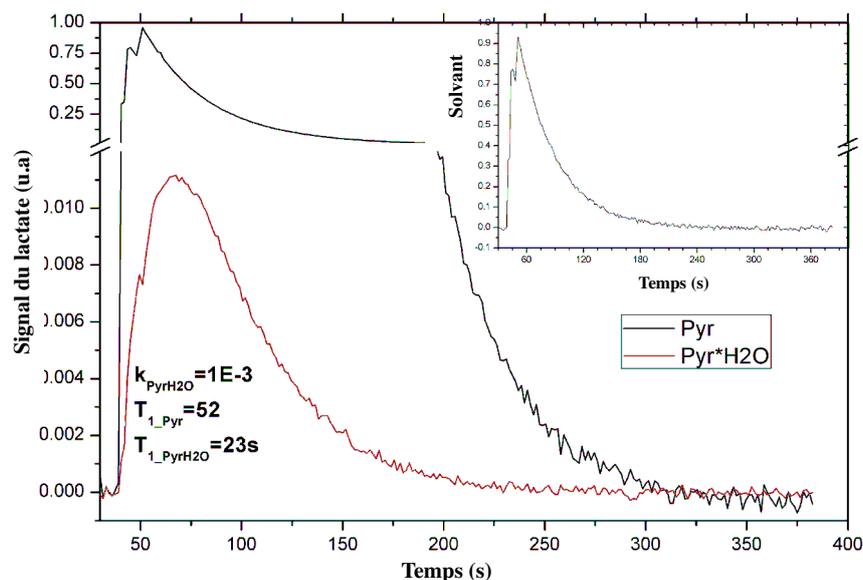


Figure 144 – Evolution de l'aimantation du substrat Pyruvate (noir) et du produit obtenu le pyruvate hydraté (rouge)

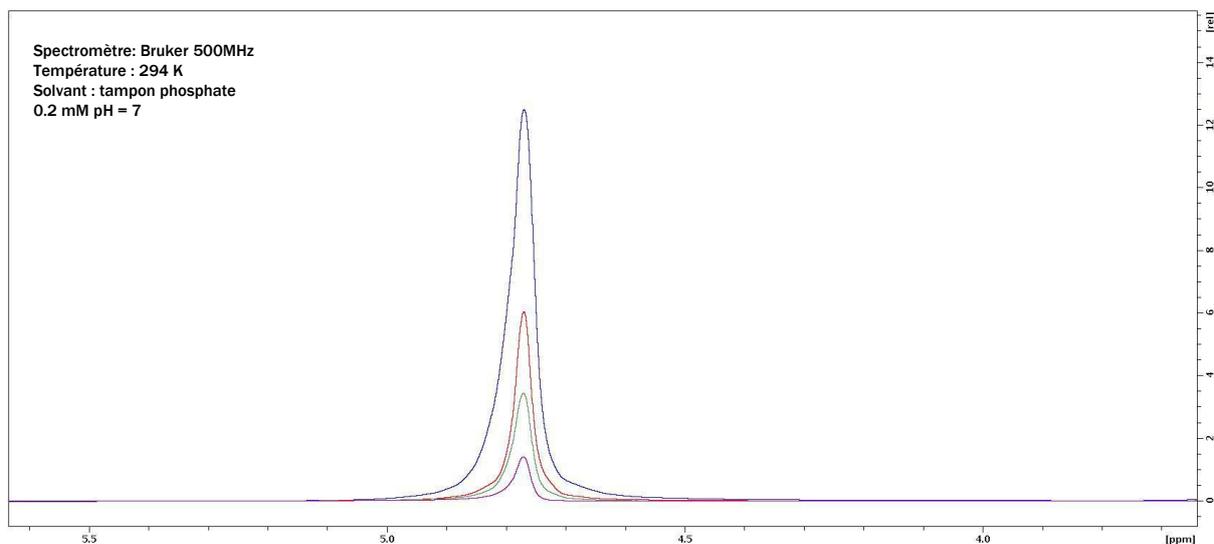
Les temps de vie de ces deux composés sont du même ordre de grandeur que pour la première lignée cellulaire. On n'observe aucune trace du lactate, cela signifie que la conversion du lactate dépend de la lignée cellulaire utilisée. La surexpression des transporteurs MTC  $4^+$  ainsi que la présence de lactate (33 mM) ajouté au milieu est nécessaire pour détecter la réaction pyruvate-lactate qui se trouve en équilibre. De plus, nous avons réalisé une expérience en omettant l'ajout de NADH dans le milieu des cellules murine MTC $4^+$ . Dans ce cas, aucune production de lactate marqué n'a été observée. Ceci démontre que ce co-enzyme est nécessaire pour la réaction étudiée.

## 6. Essai sur la protéine USrc non marquée

Ces résultats étant prometteurs, nous avons réalisé deux tests sur notre protéine USrc non marquée. Dans le premier cas, nous avons polarisé l'eau deutérée  $\text{D}_2\text{O}$  : 2 : 1  $\text{D}_2\text{O}$  /  $\text{d}_6$ -Ethanol contenant 33 mM de TEMPOL. Le tube RMN contenait la protéine USrc de concentration 0.2 mM (460  $\mu\text{l}$ ) et 40  $\mu\text{l}$  de  $\text{D}_2\text{O}$ . La polarisation de l'eau deutérée est beaucoup plus courte (30 min) que pour les  $^{13}\text{C}$ . Afin de pouvoir conserver notre échantillon de protéine USrc après le mélange de la solution polarisée, nous avons ajouté 66 mM d'acide ascorbique pour neutraliser les radicaux. Trois types d'acquisitions ont été lancés : le suivi de l'aimantation  $^1\text{H}$ , celui des  $^{15}\text{N}$  et celui des  $^{13}\text{C}$ .

En ce qui concerne les expériences des  $^{15}\text{N}$  et des  $^{13}\text{C}$ , nous n'avons obtenu aucun signal. Cela étant certainement dû à l'absence de marquage de la protéine. Dans les expériences  $^1\text{H}$ , nous observons une

décroissance de l'aimantation de l'eau deutérée (Figure 145) et nous n'avons obtenu aucun résultat exploitable pour notre protéine.



**Figure 145 – Evolution de l'aimantation du signal de l'eau au fur et à mesure du temps (bleu vers violet)**

Dans une seconde expérience, nous avons polarisé USrc. Pour cette expérience, nous avons prélevé 100  $\mu$ l à 0.2 mM d'USrc dans lequel nous avons introduit 50  $\mu$ l de TEMPOL dans un solvant D<sub>2</sub>O d<sub>6</sub>-Ethanol (2 : 1). La polarisation d'USrc a duré 3 h dû fait que la protéine ne soit pas marquée. Le tube dans le spectromètre d'acquisition ne contenait pas d'échantillon. Cette expérience a été infructueuse, nous n'avons pu obtenir de signaux dans les trois expériences (<sup>1</sup>H, <sup>15</sup>N et <sup>13</sup>C). Il serait éventuellement nécessaire d'utiliser une protéine marquée pour observer un signal.

# **Conclusion**



## Conclusion

---

La RMN est une technique analytique peu sensible mais très utilisée dans les analyses quotidiennes de protéines ou composés organiques. Pendant les deux dernières décennies, il a été montré que les études structurales et d'interactions de protéines et/ou de biomolécules en solution tampon n'étaient pas forcément en adéquation avec la réalité *in vivo*.

Ma thèse a consisté à développer de nouvelles méthodes RMN afin de pouvoir analyser la dynamique et l'interaction de protéines en présence de cellules, voire dans les cellules. Plusieurs méthodes ont été utilisées, telles que les LLS qui impliquent une paire de noyaux couplés (I et S) présentant des états singulet et triplets suite à une forte irradiation RF, et les LLC, basés sur le même principe et pour lesquels il existe une superposition de cohérences entre les états singulet et triplets.

Les LLS sont insensibles aux interactions dipôle-dipôle des spins concernés et sont caractérisées par une constante de temps  $T_{LLS}$  beaucoup plus longue que le  $T_1$ . Ils sont utiles pour la détection des interactions protéines-ligands, l'étude du dépliement d'une protéine, la mesure de faibles coefficients de diffusion.

Les LLC sont, quant à elles, insensibles à la présence d'inhomogénéités dans le champ magnétique principal  $B_0$  et permettent d'augmenter la résolution notamment par une dispersion spectrale dans une seconde dimension.

Au cours de ce travail de thèse, ces deux techniques ont été appliquées sur différents systèmes biologiques, tels qu'un dipeptide pour la mise au point, une protéine structurée, l'Ubiquitine, et une protéine issue de c-Src dont les domaines étudiés (USrc) sont définis comme intrinsèquement désordonnés. La protéine c-Src a un intérêt majeur car elle est impliquée dans de nombreux processus cellulaires tels que l'invasion cellulaire et la mort cellulaire, elle est régulièrement retrouvée dans les diverses cellules cancéreuses. Son extrémité N-terminale (USrc) a un rôle clef dans son fonctionnement par son interaction avec la membrane plasmique. Ce domaine a été étudié au cours de ce travail en utilisant les états à long temps de vie, et des valeurs  $T_{LLS}$  relativement élevées (par rapport au  $T_1$ ) ont été obtenues pour les sérines et les glycines présentes dans ce domaine. Nous avons également mis au point une méthode utilisant les LLC afin d'obtenir une séparation des signaux des glycines dans une seconde dimension. Deux glycines ont pu être isolées et attribuées sans ambiguïté parmi les 11 résidus glycine de cette protéine, démontrant de ce fait la preuve de concept de cette méthodologie.

De manière complémentaire, nous avons mis au point un prototype de montage pour la dissolution-DNP. Les premiers essais prometteurs sur l'hyperpolarisation du pyruvate en présence de cellules CCL39 et de NADH exogène ont donné des résultats très prometteurs permettant d'observer l'apparition d'un signal correspondant au lactate, produit dans les cellules par la conversion du pyruvate par la LDH. L'aimantation du C1 du lactate possède dans ces conditions une durée de vie de  $T_1 = 60.2$  s. Nous avons également réalisé un essai avec la protéine USrc.

De plus, nous avons effectué des expériences de RMN directement dans les cellules, sur le fluochrome Alexa Fluor 568 introduit dans la cellule par électroporation. Nous avons ainsi pu confirmer visuellement l'entrée de ce composé dans la cellule.

Nous nous sommes ensuite intéressés à une petite protéine de 24 acides aminés issue d'I $\kappa$ B $\alpha$ , protéine impliquée dans la réponse inflammatoire. Cette protéine possède deux sites de phosphorylations réalisées *in vivo* par une kinase IKK $\beta$ . Afin de suivre cette phosphorylation directement dans les cellules, nous avons étudié les spectres RMN de la protéine I $\kappa$ B $\alpha$  diphosphorylée ou I $\kappa$ B $\alpha$  non phosphorylée introduits respectivement dans des cellules par électroporation. Ces deux protéines se distinguent essentiellement par une différence de déplacement chimique des deux sérines qui peuvent être phosphorylées. Cependant la présence de milieu de culture dans les échantillons masque les signaux du système étudié et ne nous a pour l'instant pas permis de conclure sur ce point.

L'ensemble des résultats obtenus au cours de cette thèse encourage le développement de ces nouvelles méthodes pour la RMN *in cell*, qui est un enjeu scientifique important.

Cette thèse a fait l'objet de plusieurs publications et communications :

R. Balzan, L. Fernandes, A. Comment, L. Pidial, B. Tavitian, P.R. Vasos, (2015), "Dissolution-Dynamic Nuclear Polarization Instrumentation for Real-Time Enzymatic Reaction Rate Measurements by NMR", Journal of Visualized Experiments, (accepted)

A. Sadet, L. Fernandes, F. Kateb, R. Balzan, and P. R. Vasos (2014), "Long-lived coherences: Improved dispersion in the frequency domain using continuous-wave and reduced-power windowed sustaining irradiation" J. Chem. Phys. 141, 054203. <http://dx.doi.org/10.1063/1.4891565>

L. Fernandes, A. Sadet, A. Bolopion, Ph. Beaune, G. Bertho, F. Kateb, and P. R. Vasos, (2013), "Hauts champs, pour la RMN des protéines désordonnées et la métabolomique de milieux complexes" N°295 Pages 42 à 48 - Presse Communication International Spectra Analysis

L. Fernandes, C. Guerniou, I. Marín-Montesinos, M. Pons, F. Kateb, and P.R. Vasos, (2013), "Long-lived states in an intrinsically disordered protein domain". *Magn. Reson. Chem.*, 51: 729–733. doi: 10.1002/mrc.4008

S. Cavadini, L. Fernandes, and P.R. Vasos, "Long-Lived States and Coherences for Line Narrowing, DNP, and Study of Interactions", in *eMagRes* (John Wiley & Sons) (2011) <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/9780470034590.emrstm1255/abstract>

A. Bornet, P. Ahuja, R. Sarkar, L. Fernandes, S. Hadji, S.Y. Lee, A. Haririnia, D. Fushman, G. Bodenhausen, P.R. Vasos, "Long-Lived States to Monitor Protein Unfolding by Proton NMR", *Chemphyschem: A European Journal of Chemical Physics and Physical Chemistry*, 12 (2011), 2729–34. <http://dx.doi.org/10.1002/cphc.201100365>

#### **Colloque Journée de l'école doctorale MTCI 2015 (Poster et présentation flash)**

Laetitia Fernandes, Fatiha Kateb, Riccardo Balzan et Paul Vasos

« Application de nouvelles méthodes RMN à l'étude de protéines intrinsèquement désordonnées »

#### **Colloque Journée de l'école doctorale MTCI 2014 (Poster)**

Laetitia Fernandes, Fatiha Kateb, Riccardo Balzan et Paul Vasos

« Optimisation de méthodes RMN pour l'étude de biomolécules dans un environnement cellulaire. »

#### **Colloque DIM Analytics 2013 (communication orale)**

« RMN des protéines intrinsèquement désordonnées, nouvelles sondes pour l'analyse de leurs fonctions cellulaires. »

#### **Colloque DIM Analytics 2013 (Poster)**

Laetitia Fernandes, Fatiha Kateb et Paul Vasos

« Enhanced NMR for Sensing Target Biomolecules in the Cellular Environment. »



# **Annexes**



# Annexes

---

## A. Mode opératoire détaillé de la synthèse protéique d'USrc

### 1. Préparation du milieu et des tampons

#### a. Préparation du milieu M9 marqué :

Pour 500 ml d'eau ultra pure :

- 3 g de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$
- 1.5 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$
- 0.25 g  $\text{NaCl}$
- 0.5 g  $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$

Afin que le milieu M9 soit stérile, il subit un cycle à l'autoclave puis on rajoute de manière stérile :

- 500  $\mu\text{l}$   $\text{MgSO}_4$  1 M stérile
- 150  $\mu\text{l}$   $\text{CaCl}_2$  1 M stérile
- 5 ml Glucose 5% stérile
- 500  $\mu\text{l}$  de Ampiciline (50 mg / ml dans  $\text{H}_2\text{O}$ )
- 500  $\mu\text{l}$  de Chloremphénicol (25 mg / ml dans éthanol)
- 500  $\mu\text{l}$  de Thiamine (1mg / ml dans eau pure stérilisé)

#### b. Préparation du tampon de lyse : L

Pour 1 L d'eau ultra pure :

- Tris-HCl 100 mM
- NaCl 150 mM
- EDTA 1 mM
- $\text{NaN}_3$  0.01%

Le pH est ajusté à 7.5.

#### c. Préparation du tampon de rinçage : R

La préparation et la composition du tampon de rinçage sont identiques au tampon de lyse mais le pH est ajusté à 8 :

- Tris-HCl 100 mM
- NaCl 150 mM

- EDTA 1 mM
- NaN<sub>3</sub> 0.01%

#### **d. Préparation du tampon d'élution : E**

Le tampon d'élution est préparé à partir du tampon de lavage auquel on rajoute de la d-desthiobiotine à 2.5 mM.

#### **e. Préparation du tampon pour l'analyse RMN**

Il faut un tampon Phosphate à 50 mM, dans lequel on ajoute

- 20 µl d'EDTA 0.5 mM
- 5 mg de NaN<sub>3</sub> 0.01%
- 1 pointe de spatule de PMSF (*Fluorure de phénylméthylsulfonyle*)

## **2. Transformation des bactéries Rosetta BL21**

A partir d'un aliquote de cellules Rosetta compétentes (20 µl), on ajoute 1 µl (100 ng) de plasmide contenant l'ADN de la protéine d'intérêt.

L'intégration du plasmide dans la bactérie se réalise par choc thermique :

- 5 min dans la glace
- 40 s à 42°C
- 1 min dans la glace à nouveau

On y ajoute ensuite 500 µl de milieu LB et on le laisse 1 heure à 37°C.

On réalise une pré-culture avant d'effectuer l'expression de la protéine. Pour cela on prépare dans 100 ml de milieu de culture LB :

- 100 µl Chloramphenicol (25 mg / ml dans éthanol)
- 100 µl Ampiciline (50 mg / ml dans H<sub>2</sub>O)
- Aliquote de bactéries Rosetta compétentes

On laisse pousser dans un erlenmeyer à 37°C sous agitation pendant toute une nuit.

## **3. Expression de la protéine USrc marquée <sup>15</sup>N**

- Séparation de la pré-culture dans 4 flacons de 50 ml (25 ml dans chacun).

- Centrifugation à 3000 rpm pendant 10 min.
- Obtention de culot de bactéries.
- Dissolution d'un culot dans du milieu M9 et transfert dans un erlenmeyer.
- Le procédé est réitéré pour chaque flacon (x4).
- Les quatre erlenmeyers sont placés dans une chambre de pousse à 37°C sous agitation afin d'accroître la population bactérienne. Suivi de la pousse par observation de la densité optique (DO) à 295 nm toutes les heures.
- Lorsque la DO est comprise entre 0.6 et 0.8, arrêt la pousse à 37°C, ajout de 5 ml d'IPTG (1 mM) dans chaque erlenmeyer et mise sous agitation toute une nuit à 22°C.
- Le lendemain, transfert du contenu des erlenmeyers dans un récipient compatible à la centrifugeuse à 6000 rpm pendant 10 min.
- On obtient un culot de bactéries que l'on peut congeler ou utiliser pour procéder à l'extraction et à la purification de la protéine.

#### 4. Purification du premier culot de bactéries

##### a. Préparation des produits pour la lyse des bactéries

- **Lysosyme** 0.625 mg dilué dans 1 ml de tampon de lyse
- **Antiprotéase** (complete edta free) 1/2 cp dans 500 µl tampon de lyse
- **ADNase** 1.9 mg dilué dans 300 µl tampon de lyse

##### b. Lyse des bactéries

- Pesée du culot cellulaire.
- Dissolution de ce culot dans du tampon de lyse (pH 7.5). Le récipient est maintenu dans un bain de glace afin de ne pas avoir de surchauffe.
- Ajout du PMSF (*Fluorure de phénylméthylsulfonyle*) et de 300µl de solution de lysosyme préparée.
- Agitation du culot pendant 15 min.
- Sonication du milieu avec des cycles de 6 fois 30 secondes avec 30 secondes d'arrêt. Le récipient est toujours maintenu dans un bain de glace.
- Après refroidissement de l'échantillon, ajout de l'antiprotéase (160 µl) et de l'ADNase (100 µl) et mise sous agitation pendant 15 min.
- Centrifugation du mélange pendant 45 min à 12 000 rpm sur le JA 25.50.

### c. Préparation de la colonne Strep-Tactin®

- Dans un flacon de 15 ml, y introduire 8 ml de bille sepharose Strep-Tactin® (IBA) et ajout du tampon de rinçage (pH 8) jusqu'à 14 ml.
- Centrifugation des billes pendant 5 min à 3000 rpm.
- Retrait du surnageant.
- Rincer 3 fois de la même manière.
- Puis y transférer le surnageant issu de la centrifugation de la solution contenant la protéine. Les protéines non solubles ont précipitées et notre protéine se situe dans le surnageant.
- Mise sous agitation de notre protéine avec les billes de résine pendant 16 h à 4°C.

### d. Purification de la protéine

La protéine possède un *strep-tag* la purification se réalise donc par affinité avec la colonne Strep-Tactin®.

- Transfert des billes avec le surnageant qui ont été agitées toute une nuit sur une colonne munie d'un robinet pour réguler le débit.
- Récupération d'une première fraction, appelée FT (*flowthrough*) qui contient des protéines non désirées et non affines avec la colonne Strep-Tactin®.
- Rinçage de la colonne par élution de plusieurs ml (environ 10ml x 3) par le tampon R.
- Récupération de 3 fractions de lavage appelées L1 L2 et L3.
- Elution de notre protéine en ajoutant le tampon E contenant de la d-desthiobiotine.
- Fractionnement par 2 ml (correspondant à 0.5 volume de bille).
- Chaque fraction du FT aux fractions d'élution, est testée au Bradford, test colorimétrique.
- La solution prend une couleur bleue plus ou moins intense selon la quantité de protéines.
- Dosage par UV à 595 nm.
- Reconcentration des fractions par centrifugation (Amicon Ultra-0,5 ml®) à 100 µl environ.

### e. Gel électrophorèse SDS-page (sodium dodecyl sulfate) des fractions

- Préparation du tampon échantillon (bleu réducteur) avec 100 µl de XT buffer sample 4x et 20 µl de XT réducteur agent 20x.
- Préparation des échantillons : pour chaque échantillon, prélèvement de 10 µl de la solution reconcentrée, 10 µl d'eau pure, 10 µl de réactif.
- Les fractions sont chauffées dans un bain bouillant pendant 3 min.
- Préparation du tampon MES (*2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid*) pour l'électrophorèse avec 22.5 ml de XT MES 20X et 422.5 ml d'eau pure.
- Le gel de l'électrophorèse est sous forme de kit de Criterion XT 12 puits.
- Rinçage des puits à l'aide du tampon MES.
- Remplissage des deux cavités de la cuve avec le tampon MES.

- Chaque puits est rempli avec les 30  $\mu$ l d'échantillon sauf pour le marquage de poids moléculaire (Biorad 161-0373) qui est de 15  $\mu$ l.
- L'électrophorèse dure 45 min environ à 200 V 185 mA.
- La révélation se réalise au bleu de Comassie 1X pendant 1 heure,
- Puis rinçage avec un agent décolorant (Acide acétique 10%, MeOH 10% dans 1 L d'eau pure) pendant plusieurs heures.

#### **f. Analyse par RMN**

- Rassemblement des fractions contenant notre protéine.
- L'échantillon est transféré dans un centricon de 4 ml,
- Suivi de deux rinçages avec le tampon d'analyse (tampon phosphate) pH 7 en réalisant une centrifugation de 3 000 rpm pendant 15 min.
- Obtention d'un échantillon de 500  $\mu$ l.

#### **g. Dosage de la protéine USrc exprimée**

Le dosage est réalisé avec l'aide de deux techniques :

- Le Nanodrop<sup>®</sup> qui réalise une lecture à une densité optique de 280 nm
- Une courbe de calibration avec le test BCA dont la lecture de la densité optique est 560 nm.
- La gamme étalon est réalisée avec du BSA (Bovine Serum Albumin) de 0 à 1 mg / ml.



## B. Mode opératoire de la préparation des tampons pour l'étude de la sérine

### 1. Préparation des différentes solutions tampon

#### a. Tampon acétate 50 mM ( $\text{CH}_3\text{COOH} / \text{CH}_3\text{COO}^-$ ) pH = 5

- pKa = 4.75
- Volume final 10 ml
- masse = 70.31 mg
- Mw = 136.08  $\text{g mol}^{-1}$

Ajout de 5 mL de  $\text{H}_2\text{O}$  pure.

Ajout progressif de solution de HCl 0.1N (200  $\mu\text{l}$ ). Ajustement avec la solution de NaOH 1N jusqu'à obtention du pH souhaité. Compléter le volume avec de l'eau pure.

#### b. Tampon acétate 50 mM ( $\text{CH}_3\text{COOH} / \text{CH}_3\text{COO}^-$ ) pH = 4

Prélèvement de 1 ml de solution à pH = 4 ajuster avec ajout de HCl 1N

#### c. Tampon phosphate 50 mM ( $\text{H}_2\text{PO}_4^- / \text{HPO}_4^{2-}$ ) pH = 7

- pKa = 7.2
- 0.46 g de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (Mw = 178.05  $\text{g mol}^{-1}$ ) dissouts dans 50 ml d'eau pure
- 0.36 g de  $\text{Na}_2\text{H}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  (Mw = 138.01  $\text{g mol}^{-1}$ ) dissouts dans 50 ml d'eau pure

A partir de la solution basique, ajout progressif de la solution acide jusqu'à l'obtention d'un pH = 7.

#### d. Tampon phosphate 50 mM ( $\text{H}_2\text{PO}_4^- / \text{HPO}_4^{2-}$ ) pH = 6

Prélèvement de 1 ml de solution à pH = 6 ajuster avec ajout de HCl 1N.

#### e. Tampon Tris 50 mM ( $\text{C}_4\text{H}_{11}\text{NO}_3$ ) pH = 8

- pKa = 8.3 à 25°C
- Volume final 10.2 ml
- m = 62 mg
- Mw = 121.14  $\text{g mol}^{-1}$

Même protocole que pour le tampon acétate pH = 5

#### f. Tampon Tris $\text{C}_4\text{H}_{11}\text{NO}_3$ 50 mM pH = 9

Préparé à partir du tampon pH = 8 en prélevant 1 ml et en y ajoutant une goutte de NaOH 1N.

**g. Tampon Carbonate 50 mM ( $\text{HCO}_3^- / \text{CO}_3^{2-}$ ) pH = 11**

- pka = 10.33
- Volume final = 8.3ml
- m = 44.02 mg
- Mw = 105.99  $\text{g mol}^{-1}$

Même protocole que pour le tampon acétate pH = 5

**h. Tampon Carbonate 50 mM ( $\text{HCO}_3^- / \text{CO}_3^{2-}$ ) pH = 10**

Préparé à partir du tampon pH = 11 en prélevant 1 ml et en y ajoutant une goutte de HCl 1N.

**2. Préparation des échantillons de sérine (20 mM)**

Les échantillons de sérines sont préparés à partir de 1.10 mg environ de L-sérine Mw = 105.09  $\text{g mol}^{-1}$  diluée dans 450  $\mu\text{l}$  de solution tampon et 50  $\mu\text{l}$  de  $\text{D}_2\text{O}$ . Le tampon est réajusté par ajout de NaOH 1N ou HCl 1N.

## C. Mode opératoire détaillé de l'électroporation

### 1. Préparation des composés à électroporer

#### a. Protéine IKB $\alpha$ non Phosphorylée à 150 $\mu$ M

- $M_w = 2\,980\text{ gmol}^{-1}$
- $m = 0.29\text{ mg}$
- Volume de tampon phosphate 50 mM = 20  $\mu$ l

#### b. Protéine IKB $\alpha$ diPhosphorylée à 150 $\mu$ M

- $M_w = 3\,130\text{ gmol}^{-1}$
- $m = 0.31\text{ mg}$
- Volume de tampon phosphate 50 mM = 20  $\mu$ l

#### c. Fluorochrome Alexa fluor 564<sup>®</sup> à 25 $\mu$ M :

- $M_w = 792\text{ gmol}^{-1}$
- $m = 0.6\text{ mg}$
- Volume de tampon phosphate 50 mM = 150  $\mu$ l
- Ajout de 3  $\mu$ l dans chaque échantillon
- Volume final de l'échantillon 620  $\mu$ l

#### d. Préparation de l'échantillon GFP à 0,1pM

- $M_w = 27\text{ kDa}$
- Concentration solution mère 0.5  $\mu$ g /  $\mu$ l
- 4  $\mu$ l dans chaque solution

### 2. Préparation des cellules à électroporer

Il s'agit de cellule HepG2. Elles sont cultivées dans du milieu EMEM (*Eagle's Minimum Essential Medium*) supplémenté de 10 % de sérum veau fœtal.

Lorsque la culture arrive à confluence, les cellules sont trypsinées avec de la trypsin-EDTA (2 - 3 ml) pendant 15 min maximum. La solution est neutralisée avec du milieu de culture (6 à 8 ml). Les cellules sont ensuite transférées dans un flacon pour être centrifugées, le surnageant est éliminé par

aspiration. On obtient ainsi un culot sec de cellules, celui-ci est ensuite resuspendu dans du milieu de culture neuf. Les cellules sont ensuite comptées et séparées en culot sec de 1 million de cellules.

### 3. Electroporation dans les cellules HepG2

Préparation du réactif extemporanément à sortir du réfrigérateur afin que les produits soient à température ambiante.

Pour un échantillon :

- 82  $\mu$ l de Nucleofector solution
  - 18  $\mu$ l de supplément
- 
- Resuspension du culot cellulaire dans 100  $\mu$ l de réactif d'électroporation
  - Ajout de la quantité choisie du composé à électroporer
  - Homogénéisation avec une pipette
  - Introduction de la solution obtenue dans la cellule d'électroporation (Amaxa<sup>®</sup> cell line nucleofector kit V)

Le mode d'électroporation est le mode prédéfini H-022 (80 % de viabilité)

- Neutralisation du réactif par 500  $\mu$ l de milieu de culture
- Prélèvement de 30  $\mu$ l pour observation en microscopie à fluorescence
- Ajout de 50  $\mu$ l de D<sub>2</sub>O pour l'observer en RMN

## 4. Spectres 1D $^1\text{H}$ acquis lors des expériences d'électroporation

### a. IKB $\alpha$

Figure 127 :

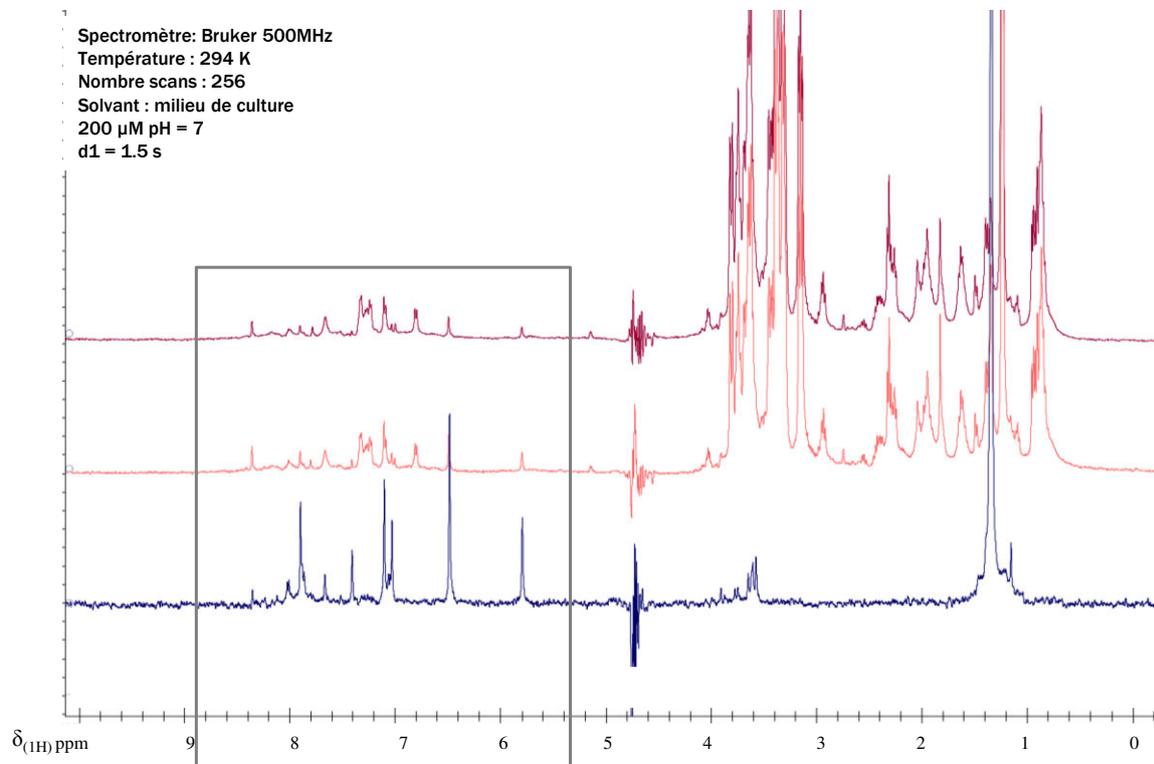


Figure 146 – Evolution de l'ajout de lysat cellulaire dans la solution d'Alexa Fluor dans le tampon phosphate V = 0  $\mu\text{l}$  (bleu) ajout de V = 100  $\mu\text{l}$  de lysat cellulaire (rose), ajout de V = 200  $\mu\text{l}$  de lysat cellulaire (rouge)  
Le cadre gris représente la partie du spectre étudiée dans la Figure 127

Figure 129 :

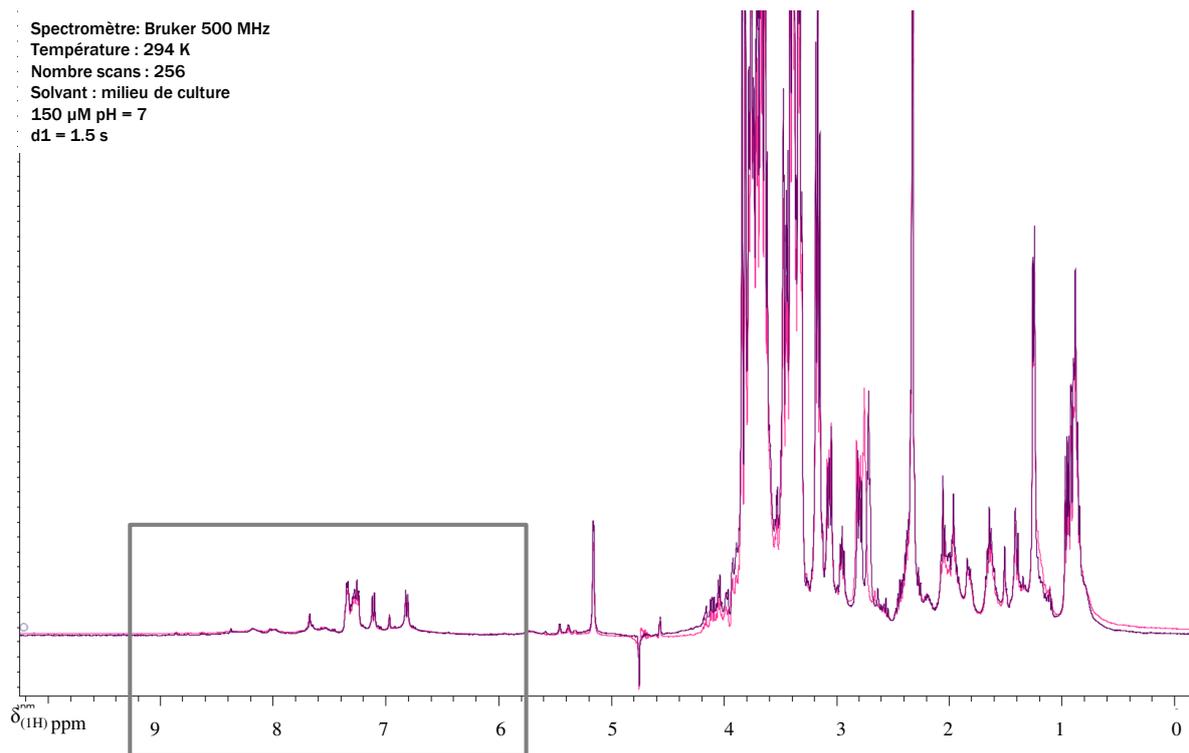


Figure 147 - Superposition des spectres d' $\text{IkBa}$  -  $\text{IkBa}$  diphosphorylée électroporée dans les cellules (rose),  $\text{IkBa}$  non phosphorylée électroporée dans les cellules (violet)  
Le cadre gris représente la partie du spectre étudiée dans la Figure 127

Figure 131 :

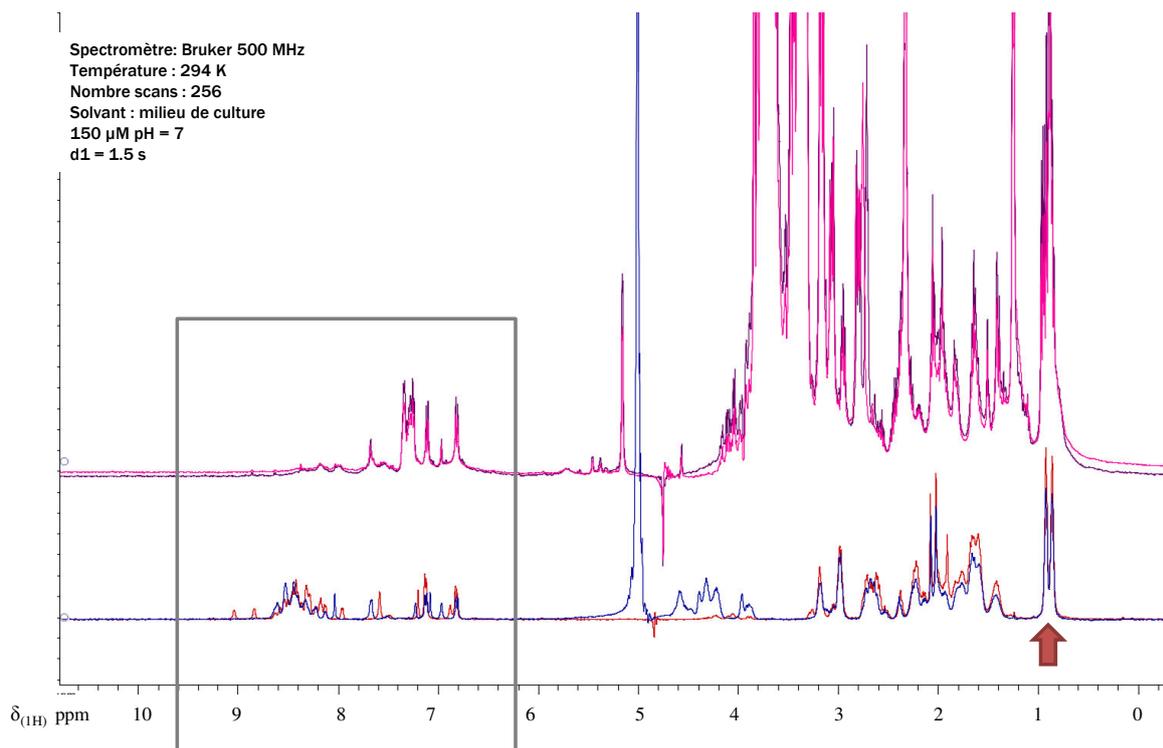


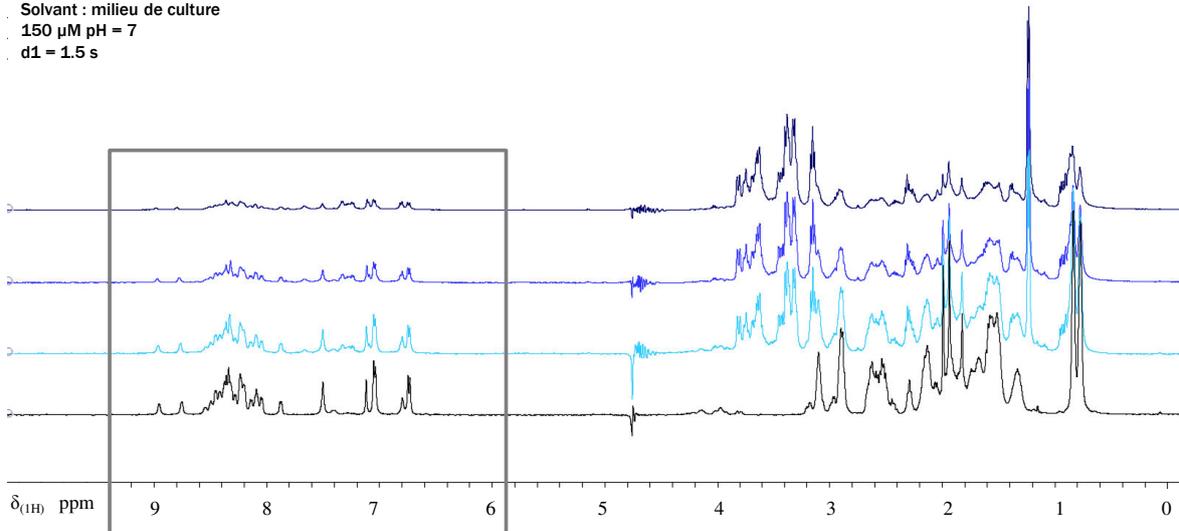
Figure 148 - Superposition des spectres d'IκBα électroporée ou non

IκBα diphosphorylée dans du tampon phosphate (rouge), IκBα non phosphorylée dans du tampon phosphate (bleu), IκBα diphosphorylée électroporée dans les cellules (rose), IκBα non phosphorylée électroporée dans les cellules (violet), alignement des spectres par rapport au doublet de la leucine à 0.8 ppm (indiquer par une flèche rouge).

Le cadre gris représente la partie du spectre étudiée dans la Figure 131

Figure 132 :

Spectromètre: Bruker 500 MHz  
Température : 294 K  
Nombre scans : 256  
Solvant : milieu de culture  
150  $\mu$ M pH = 7  
d1 = 1.5 s



**Figure 149 - Effet de l'ajout progressif de lysat cellulaire dans une solution d'I $\kappa$ B $\alpha$  diphosphorylée (200  $\mu$ M), zoom sur la région comprise entre 6 et 10 ppm (bas)**

**de bas vers le haut : dans le tampon phosphate  $V_{(\text{lysate cellulaire})} = 0 \mu\text{l}$  (noir) ajout de  $V_{(\text{lysate cellulaire})} = 50 \mu\text{l}$  de lysat cellulaire (turquoise), ajout de  $V_{(\text{lysate cellulaire})} = 100 \mu\text{l}$  de lysat cellulaire (bleu), ajout de  $V_{(\text{lysate cellulaire})} = 200 \mu\text{l}$  de lysat cellulaire (bleu foncé)**

**Le cadre gris représente la partie du spectre étudiée dans la Figure 132**

## b. IKK $\beta$

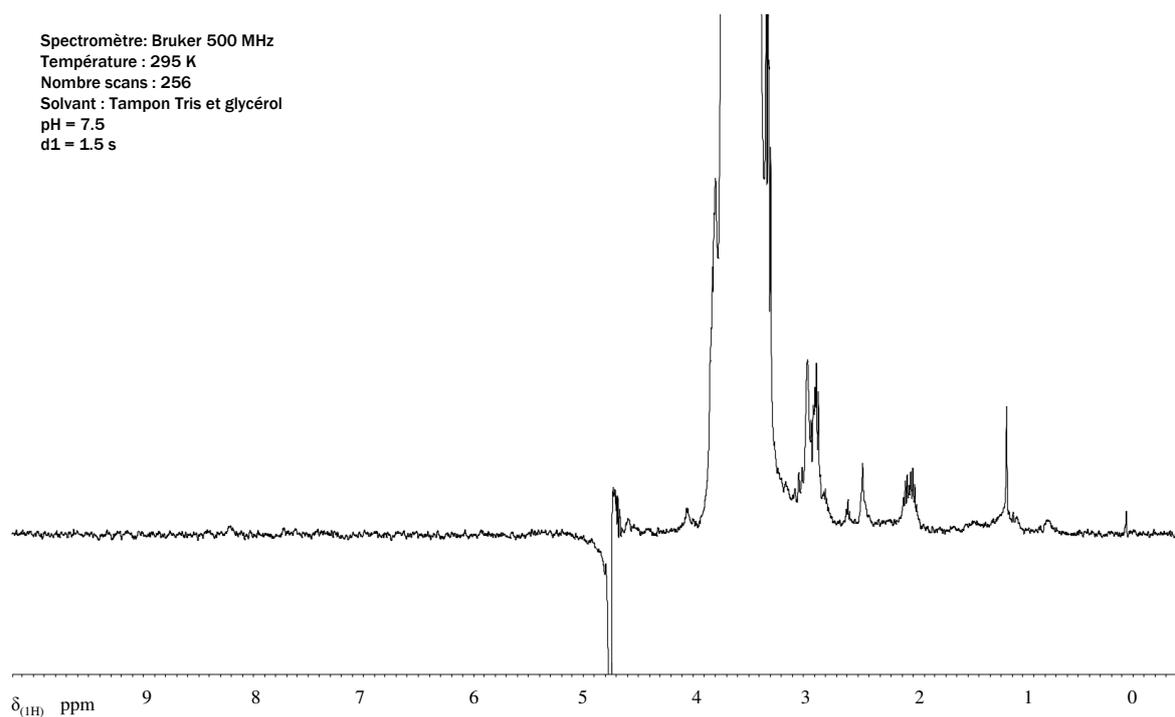


Figure 150 - Spectre d'IKK $\beta$

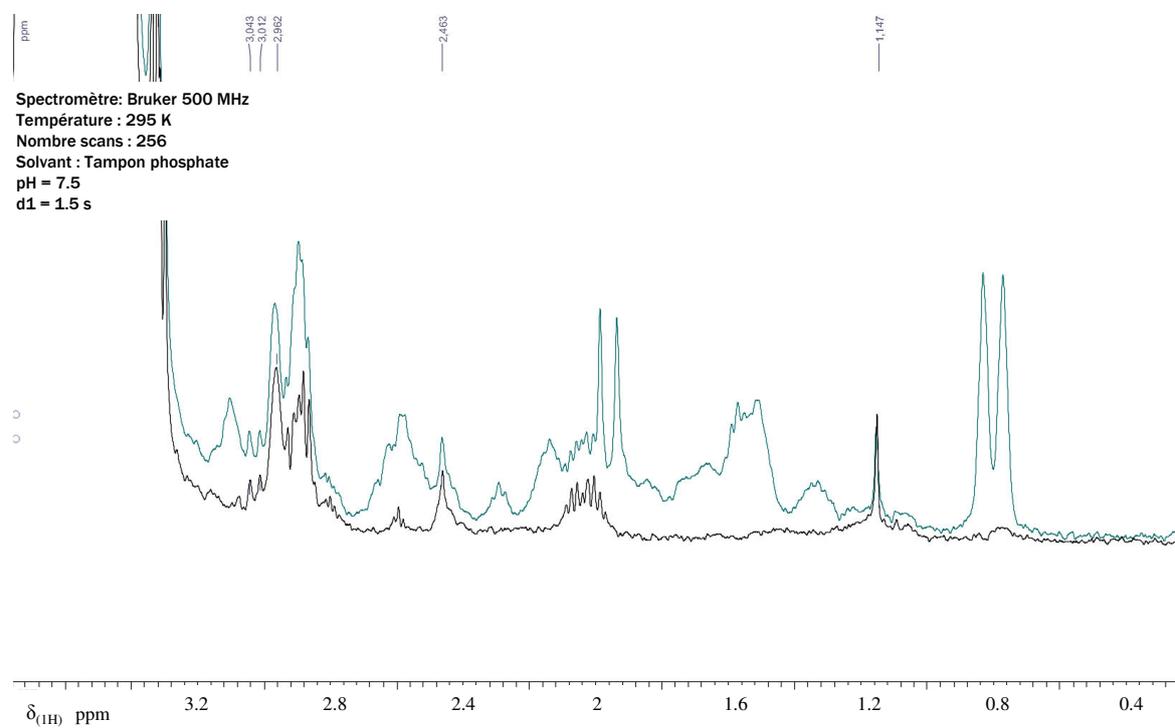
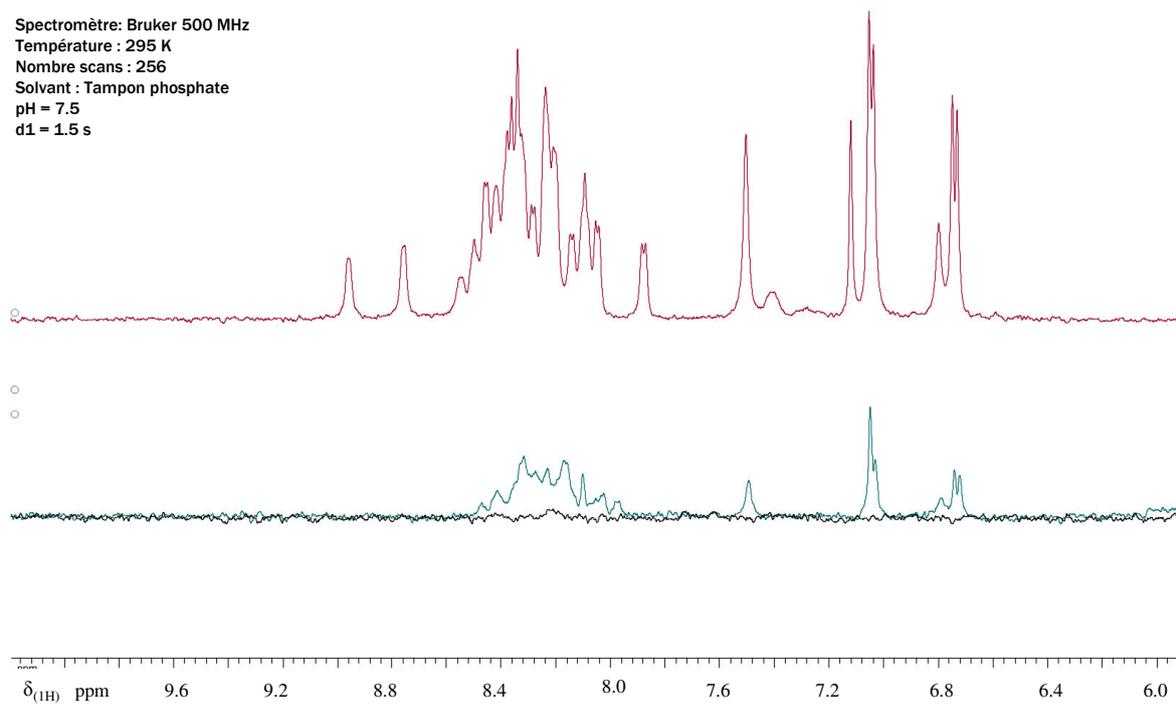


Figure 151 - Spectre d'I $\kappa$ B $\alpha$  en présence d'IKK $\beta$   
Comparaison avec le spectre de IKK $\beta$  dans le tampon phosphate (noir)

Spectromètre: Bruker 500 MHz  
Température : 295 K  
Nombre scans : 256  
Solvant : Tampon phosphate  
pH = 7.5  
d1 = 1.5 s



**Figure 152 - Zoom du spectre d'IκBα en présence d'IKKβ**  
**Comparaison avec le spectre de IKKβ dans le tampon phosphate (noir) et IκBα diphosphorylée (rouge)**

# **Bibliographie**



## Bibliographie

---

- (1) Chen, H.-Y.; Ragavan, M.; Hilty, C. *Angew. Chem.* **2013**, *125* (35), 9362–9365.
- (2) Loening, N. M.; Rosay, M.; Weis, V.; Griffin, R. G. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124* (30), 8808–8809.
- (3) Günther, U. L. *Top. Curr. Chem.* **2013**, *335*, 23–69.
- (4) Carravetta, M.; Levitt, M. H. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126* (20), 6228–6229.
- (5) Sarkar, R.; Ahuja, P.; Vasos, P. R.; Bodenhausen, G. *Phys. Rev. Lett.* **2010**, *104* (5), 053001.
- (6) Hore, P. J. *Nuclear Magnetic Resonance*, 1 edition.; Oxford University Press: Oxford ; New York, 1995.
- (7) Hore, P. J.; Jones, J. A.; Wimperis, S. *NMR: The Toolkit*, 1 edition.; Oxford University Press: Oxford ; New York, 2000.
- (8) Keeler, J. *Understanding NMR Spectroscopy, Second Edition*, 2 edition.; Wiley: Chichester, U.K, 2010.
- (9) Cavadini, S.; Fernandes, L.; Vasos, P. R. In *eMagRes*; John Wiley & Sons, Ltd, 2007.
- (10) Gerlach, W.; Stern, O. *Z. Für Phys.* **1922**, *9* (1), 349–352.
- (11) Shampo, M. A.; Kyle, R. A.; Steensma, D. P. *Mayo Clin. Proc.* **2012**, *87* (2), e11.
- (12) Shampo, M. A.; Kyle, R. A. *Mayo Clin. Proc.* **1997**, *72* (6), 585.
- (13) Hahn, E. L. *Phys. Rev.* **1950**, *80* (4), 580–594.
- (14) Proctor, W. G.; Yu, F. C. *Phys. Rev.* **1950**, *77* (5), 717–717.
- (15) Akoka. In *Introduction à la resonance magnetique nucléaire*.
- (16) Harris; Becker; Cabral de Menezes. *Pure Appl Chem* **2001**, No. 73, 1795–1818.
- (17) Edwards. Pascal's Arithmetical Triangle [https://www.goodreads.com/work/best\\_book/111441-pascal-s-arithmetic-triangle-the-story-of-a-mathematical-idea-johns](https://www.goodreads.com/work/best_book/111441-pascal-s-arithmetic-triangle-the-story-of-a-mathematical-idea-johns) (accessed May 19, 2015).
- (18) Clayden, J.; Warren, S.; Greeves, N.; Wothers, P. *Chimie organique*; De Boeck Supérieur, 2002.
- (19) Jeener. *Lecture notes from Ampere Summer School in Basko Polje, Yugoslavia*; 1971.
- (20) Aue, W. P.; Bartholdi, E.; Ernst, R. R. *J. Chem. Phys.* **1976**, *64* (5), 2229–2246.
- (21) Lavalette, D.; Tétreau, C.; Tourbez, M.; Blouquit, Y. *Biophys. J.* **1999**, *76* (5), 2744–2751.
- (22) Bloembergen; Purcell. *Physical Review* **1948**, *73*, 679–746.
- (23) Meiboom, S.; Gill, D. *Rev. Sci. Instrum.* **1958**, *29* (8), 688–691.
- (24) Boyle, K.; Wesson, G. In *Methods of Experimental Physics*; 2004.
- (25) Salmon, L.; Blackledge, M. L'actualité chimique. aout 2012, pp 56–58.
- (26) Carravetta, M.; Johannessen, O. G.; Levitt, M. H. *Phys. Rev. Lett.* **2004**, *92* (15), 153003.
- (27) Warren, W. S.; Jenista, E.; Branca, R. T.; Chen, X. *Science* **2009**, *323* (5922), 1711–1714.
- (28) Ahuja, P.; Sarkar, R.; Vasos, P. R.; Bodenhausen, G. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131* (22), 7498–7499.
- (29) Sarkar, R.; Vasos, P. R.; Bodenhausen, G. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129* (2), 328–334.
- (30) Pileio, G.; Carravetta, M.; Hughes, E.; Levitt, M. H. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130* (38), 12582–12583.
- (31) Bornet, A.; Ahuja, P.; Sarkar, R.; Fernandes, L.; Hadji, S.; Lee, S. Y.; Haririnia, A.; Fushman, D.; Bodenhausen, G.; Vasos, P. R. *Chemphyschem Eur. J. Chem. Phys. Phys. Chem.* **2011**, *12* (15), 2729–2734.
- (32) Salvi, N.; Buratto, R.; Bornet, A.; Ulzega, S.; Rentero Rebollo, I.; Angelini, A.; Heinis, C.; Bodenhausen, G. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134* (27), 11076–11079.
- (33) Pileio, G.; Carravetta, M.; Levitt, M. H. *Phys. Rev. Lett.* **2009**, *103* (8), 083002.

- (34) Sarkar, R.; Ahuja, P.; Vasos, P. R.; Bornet, A.; Wagnières, O.; Bodenhausen, G. *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* **2011**, *59* (1), 83–90.
- (35) Ardenkjær-Larsen, J. H.; Fridlund, B.; Gram, A.; Hansson, G.; Hansson, L.; Lerche, M. H.; Servin, R.; Thaning, M.; Golman, K. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2003**, *100* (18), 10158–10163.
- (36) Nelson, S. J.; Kurhanewicz, J.; Vigneron, D. B.; Larson, P. E. Z.; Harzstark, A. L.; Ferrone, M.; van Criekinge, M.; Chang, J. W.; Bok, R.; Park, I.; Reed, G.; Carvajal, L.; Small, E. J.; Munster, P.; Weinberg, V. K.; Ardenkjær-Larsen, J. H.; Chen, A. P.; Hurd, R. E.; Odegardstuen, L.-I.; Robb, F. J.; Tropp, J.; Murray, J. A. *Sci. Transl. Med.* **2013**, *5* (198), 198ra108.
- (37) Jannin, S.; Comment, A.; Kurdzesau, F.; Konter, J. A.; Hautle, P.; van den Brandt, B.; van der Klink, J. J. *J. Chem. Phys.* **2008**, *128* (24), 241102.
- (38) Maly, T.; Debelouchina, G. T.; Bajaj, V. S.; Hu, K.-N.; Joo, C.-G.; Mak–Jurkauskas, M. L.; Sirigiri, J. R.; van der Wel, P. C. A.; Herzfeld, J.; Temkin, R. J.; Griffin, R. G. *J. Chem. Phys.* **2008**, *128* (5), 052211.
- (39) Reddy, T. J.; Iwama, T.; Halpern, H. J.; Rawal, V. H. *J. Org. Chem.* **2002**, *67* (14), 4635–4639.
- (40) Cheng, T.; Capozzi, A.; Takado, Y.; Balzan, R.; Comment, A. *Phys. Chem. Chem. Phys. PCCP* **2013**, *15* (48), 20819–20822.
- (41) Song, C.; Hu, K.-N.; Joo, C.-G.; Swager, T. M.; Griffin, R. G. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128* (35), 11385–11390.
- (42) Serber, Z.; Dötsch, V. *Biochemistry (Mosc.)* **2001**, *40* (48), 14317–14323.
- (43) Selenko, P.; Wagner, G. *Nat. Methods* **2006**, *3* (2), 80–81.
- (44) Selenko, P.; Wagner, G. *J. Struct. Biol.* **2007**, *158* (2), 244–253.
- (45) Pileio, G.; Carravetta, M.; Levitt, M. H. *PNAS* **2010**, *40* (107), 17135–17139.
- (46) Clarkson, R. B.; Odintsov, B. M.; Ceroke, P. J.; Ardenkjær-Larsen, J. H.; Fruianu, M.; Belford, R. L. *Physic in Medecine ad Biology* **1998**, *43* (7).
- (47) Lumata, L.; Ratnakar, S. J.; Jindal, A.; Merritt, M.; Comment, A.; Malloy, C. R.; Sherry, A. D.; Kovacs, Z. *Chem. Eur. J.* **2011**, *17*, 10825–10827.
- (48) Teissié, J.; Tsong, T. Y. *Biochemistry* **1981**, *20* (6), 1548–1554.
- (49) Téissié, J.; Rols, M. P. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1986**, *140* (1), 258–266.
- (50) Harris, T.; Eliyahu, G.; Frydman, L.; Degani, H. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2009**, *106* (43), 18131–18136.
- (51) Kendrew, J. C.; Dickerson, R. E.; Strandberg, B. E.; Hart, R. G.; Davies, D. R.; Phillips, D. C.; Shore, V. C. *Nature* **1960**, *185* (4711), 422–427.
- (52) Bloomer, A. C.; Champness, J. N.; Bricogne, G.; Staden, R.; Klug, A. *Nature* **1978**, *276* (5686), 362–368.
- (53) Muchmore, S. W.; Sattler, M.; Liang, H.; Meadows, R. P.; Harlan, J. E.; Yoon, H. S.; Nettlesheim, D.; Chang, B. S.; Thompson, C. B.; Wong, S.-L.; Ng, S.-C.; Fesik, S. W. *Nature* **1996**, *381* (6580), 335–341.
- (54) Berjanskii, M.; Wishart, D. S. *Nat. Protoc.* **2006**, *1* (2), 683–688.
- (55) Uversky, V. N. *Protein Fold. Misfolding Degrad.* **2014**, *1*, 6.
- (56) Tompa, P.; Csermely, P. *FASEB J* **2004**, *18*, 1169–1175.
- (57) Dunker, A. K.; Brown, C. J.; Lawson, J. D.; Iakoucheva, L. M.; Obradovic, Z. *Biochemistry (Mosc.)* **2002**, *41*, 6573–6582.
- (58) Tantos, A.; Han, K.-H.; Tompa, P. *Mol. Cell. Endocrinol.* **2012**, *348* (2), 457–465.
- (59) Dyson, H. J.; Wright, P. E. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2005**, *6* (3), 197–208.
- (60) Stein, A.; Pache, R. A.; Bernadó, P.; Pons, M.; Aloy, P. *FEBS J.* **2009**, *276* (19), 5390–5405.

- (61) Dunker, A. K.; Brown, C. J.; Obradovic, Z. *Adv. Protein Chem.* **2002**, *62*, 25–49.
- (62) Van der Lee, R.; Buljan, M.; Lang, B.; Weatheritt, R. J.; Daughdrill, G. W.; Dunker, A. K.; Fuxreiter, M.; Gough, J.; Gsponer, J.; Jones, D. T.; Kim, P. M.; Kriwacki, R. W.; Oldfield, C. J.; Pappu, R. V.; Tompa, P.; Uversky, V. N.; Wright, P. E.; Babu, M. M. *Chem. Rev.* **2014**, *114* (13), 6589–6631.
- (63) Iakoucheva, L. M.; Brown, C. J.; Lawson, J. D.; Obradović, Z.; Dunker, A. K. *J. Mol. Biol.* **2002**, *323* (3), 573–584.
- (64) Uversky, V. N.; Oldfield, C. J.; Dunker, A. K. *Annu. Rev. Biophys.* **2008**, *37*, 215–246.
- (65) Midic, U.; Oldfield, C. J.; Dunker, A. K.; Obradovic, Z.; Uversky, V. N. *BMC Genomics* **2009**, *10 Suppl 1*, S12.
- (66) Li, S.; Iakoucheva, L. M.; Mooney, S. D.; Radivojac, P. *Pac. Symp. Biocomput. Pac. Symp. Biocomput.* **2010**, 337–347.
- (67) Rosalyn B. Irby. **2000**, *19* (49).
- (68) Finn, R. S. *Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol. ESMO* **2008**, *19* (8), 1379–1386.
- (69) Mayer, E. L.; Krop, I. E. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **2010**, *16* (14), 3526–3532.
- (70) Kaplan, J. M.; Varmus, H. E.; Bishop, J. M. *Mol. Cell. Biol.* **1990**, *10* (3), 1000–1009.
- (71) Pérez, Y.; Maffei, M.; Igea, A.; Amata, I.; Gairí, M.; Nebreda, A. R.; Bernadó, P.; Pons, M. *Sci. Rep.* **2013**, *3*, 1295.
- (72) Sicheri, F.; Kuriyan, J. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1997**, *7* (6), 777–785.
- (73) Showalter, S. A. In *eMagRes*; John Wiley & Sons, Ltd, 2007.
- (74) Pérez, Y.; Gairí, M.; Pons, M.; Bernadó, P. *J. Mol. Biol.* **2009**, *391* (1), 136–148.
- (75) Bracken, C. *J. Mol. Graph. Model.* **2001**, *19* (1), 3–12.
- (76) Dyson, H. J.; Wright, P. E. *Methods Enzym.* **2001**, *339*, 258–270.
- (77) Dyson, H. J.; Wright, P. E. *Adv Protein Chem* **2002**, *62*, 311–340.
- (78) Amata, I.; Maffei, M.; Igea, A.; Gay, M.; Vilaseca, M.; Nebreda, A. R.; Pons, M. *ChemBioChem* **2013**, *14* (14), 1820–1827.
- (79) Rous, P. *J. Exp. Med.* **1911**, *13* (4), 397–411.
- (80) Kurth, R.; Bannert, N. *Int. J. Cancer J. Int. Cancer* **2010**, *126* (2), 306–314.
- (81) Martin, G. S. *Nature* **1970**, *227* (5262), 1021–1023.
- (82) Toyoshima, K.; Friis, R. R.; Vogt, P. K. *Virology* **1970**, *42* (1), 163–170.
- (83) Takeya, T.; Hanafusa, H. *Cell* **1983**, *32* (3), 881–890.
- (84) Martin, G. S. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2001**, *2* (6), 467–475.
- (85) Huebner, R. J.; Todaro, G. J. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1969**, *64* (3), 1087–1094.
- (86) Smart, J. E.; Oppermann, H.; Czernilofsky, A. P.; Purchio, A. F.; Erikson, R. L.; Bishop, J. M. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1981**, *78* (10), 6013–6017.
- (87) Levinson, A. D.; Oppermann, H.; Levintow, L.; Varmus, H. E.; Bishop, J. M. *Cell* **1978**, *15* (2), 561–572.
- (88) Kypta, R. M.; Goldberg, Y.; Ulug, E. T.; Courtneidge, S. A. *Cell* **1990**, *62* (3), 481–492.
- (89) Shalloway, D.; Bagrodia, S.; Chackalaparampil, I.; Shenoy, S.; Lin, P. H.; Taylor, S. J. *Ciba Found. Symp.* **1992**, *170*, 248–265; discussion 265–275.
- (90) Yu, C. L.; Meyer, D. J.; Campbell, G. S.; Larner, A. C.; Carter-Su, C.; Schwartz, J.; Jove, R. *Science* **1995**, *269* (5220), 81–83.

- (91) Carragher, N. O.; Westhoff, M. A.; Fincham, V. J.; Schaller, M. D.; Frame, M. C. *Curr. Biol. CB* **2003**, *13* (16), 1442–1450.
- (92) Sastry, S. K.; Burrige, K. *Exp. Cell Res.* **2000**, *261* (1), 25–36.
- (93) Jalali, S.; Li, Y. S.; Sotoudeh, M.; Yuan, S.; Li, S.; Chien, S.; Shyy, J. Y. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **1998**, *18* (2), 227–234.
- (94) Yeatman, T. J. *Nat. Rev. Cancer* **2004**, *4* (6), 470–480.
- (95) Roche, S.; Fumagalli, S.; Courtneidge, S. A. *Science* **1995**, *269* (5230), 1567–1569.
- (96) Brunton, V. G.; Ozanne, B. W.; Paraskeva, C.; Frame, M. C. *Oncogene* **1997**, *14* (3), 283–293.
- (97) Dunn, E. F. *The oncologist* **2009**, *14* (7), 667–678.
- (98) Masaki, T.; Okada, M.; Tokuda, M.; Shiratori, Y.; Hatase, O.; Shirai, M.; Nishioka, M.; Omata, M. *Hepatol. Baltim. Md* **1999**, *29* (2), 379–384.
- (99) Blake, R. A.; Broome, M. A.; Liu, X.; Wu, J.; Gishizky, M.; Sun, L.; Courtneidge, S. A. *Mol. Cell. Biol.* **2000**, *20* (23), 9018–9027.
- (100) Sefton, B. M.; Beemon, K.; Hunter, T. *J. Virol.* **1978**, *28* (3), 957–971.
- (101) Collett, M. S.; Erikson, R. L. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1978**, *75* (4), 2021–2024.
- (102) Sefton, B. M.; Hunter, T.; Beemon, K. *J. Virol.* **1979**, *30* (1), 311–318.
- (103) Takeya, T.; Hanafusa, H. *J. Virol.* **1982**, *44* (1), 12–18.
- (104) Jove, R.; Hanafusa, H. *Annu. Rev. Cell Biol.* **1987**, *3*, 31–56.
- (105) Bolen, J. B. *Oncogene* **1993**, *8* (8), 2025–2031.
- (106) Cantley, L. C.; Auger, K. R.; Carpenter, C.; Duckworth, B.; Graziani, A.; Kapeller, R.; Soltoff, S. *Cell* **1991**, *64* (2), 281–302.
- (107) Sadowski, I.; Stone, J. C.; Pawson, T. *Mol. Cell. Biol.* **1986**, *6* (12), 4396–4408.
- (108) Moran, M. F.; Koch, C. A.; Anderson, D.; Ellis, C.; England, L.; Martin, G. S.; Pawson, T. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1990**, *87* (21), 8622.
- (109) Mayer, B. J.; Hamaguchi, M.; Hanafusa, H. *Nature* **1988**, *332* (6161), 272–275.
- (110) Xu, W.; Harrison, S. C.; Eck, M. J. *Nature* **1997**, *385* (6617), 595–602.
- (111) Schlessinger, J.; Ullrich, A. *Neuron* **1992**, *9* (3), 383–391.
- (112) Pawson, T.; Schlessinger, J. *Curr. Biol. CB* **1993**, *3* (7), 434–442.
- (113) Songyang, Z.; Shoelson, S. E.; Chaudhuri, M.; Gish, G.; Pawson, T.; Haser, W. G.; King, F.; Roberts, T.; Ratnofsky, S.; Lechleider, R. J. *Cell* **1993**, *72* (5), 767–778.
- (114) Songyang, Z.; Margolis, B.; Chaudhuri, M.; Shoelson, S. E.; Cantley, L. C. *J. Biol. Chem.* **1995**, *270* (25), 14863–14866.
- (115) Ren, R.; Mayer, B. J.; Cicchetti, P.; Baltimore, D. *Science* **1993**, *259* (5098), 1157–1161.
- (116) Koch, C. A.; Anderson, D.; Moran, M. F.; Ellis, C.; Pawson, T. *Science* **1991**, *252* (5006), 668–674.
- (117) Waksman, G. *Cell* **1993**, *72* (5), 779–790.
- (118) Waksman, G.; Kuriyan, J. *Cell* **2004**, *116* (2 Suppl), S45–S48, 3 p following S48.
- (119) Yu, H.; Rosen, M. K.; Shin, T. B.; Seidel-Dugan, C.; Brugge, J. S.; Schreiber, S. L. *Science* **1992**, *258* (5088), 1665–1668.
- (120) Xu, W.; Doshi, A.; Lei, M.; Eck, M. J.; Harrison, S. C. *Mol. Cell* **1999**, *3* (5), 629–638.

- (121) Cowan-Jacob, S. W.; Fendrich, G.; Manley, P. W.; Jahnke, W.; Fabbro, D.; Liebetanz, J.; Meyer, T. *Structure* **2005**, *13* (6), 861–871.
- (122) Gingrich, J. R.; Pelkey, K. A.; Fam, S. R.; Huang, Y.; Petralia, R. S.; Wenthold, R. J.; Salter, M. W. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2004**, *101* (16), 6237–6242.
- (123) Hoey, J. G.; Summy, J.; Flynn, D. C. *Cell. Signal.* **2000**, *12* (9-10), 691–701.
- (124) Summy, J. M.; Qian, Y.; Jiang, B.-H.; Guappone-Koay, A.; Gatesman, A.; Shi, X.; Flynn, D. C. *J. Cell Sci.* **2003**, *116* (12), 2585–2598.
- (125) Resh, M. D. *Cell* **1994**, *76* (3), 411–413.
- (126) Thomas, S. M.; Brugge, J. S. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **1997**, *13* (1), 513.
- (127) Rawat, A.; Nagaraj, R. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* **2010**, *1798* (10), 1854–1863.
- (128) Resh, M. D. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Rev. Cancer* **1993**, *1155* (3), 307–322.
- (129) Kamps, M. P.; Buss, J. E.; Sefton, B. M. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1985**, *82* (14), 4625–4628.
- (130) Farazi, T. A.; Waksman, G.; Gordon, J. I. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276* (43), 39501–39504.
- (131) Prasad, K. K.; Toraskar, M. P.; Kadam, V. J. *Mini Rev. Med. Chem.* **2008**, *8* (2), 142–149.
- (132) Silverman, L.; Sudol, M.; Resh, M. D. *Cell Growth Differ. Mol. Biol. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **1993**, *4* (6), 475–482.
- (133) Silverman, L.; Resh, M. D. *J. Cell Biol.* **1992**, *119* (2), 415–425.
- (134) Kaplan, J. M.; Mardon, G.; Bishop, J. M.; Varmus, H. E. *Mol. Cell. Biol.* **1988**, *8* (6), 2435.
- (135) Resh, M. D. *Biochim. Biophys. Acta* **1999**, *1451* (1), 1–16.
- (136) Resh, M. D. *Sci. STKE Signal Transduct. Knowl. Environ.* **2006**, *2006* (359), re14.
- (137) Buss, J. E.; Kamps, M. P.; Gould, K.; Sefton, B. M. *J. Virol.* **1986**, *58* (2), 468–474.
- (138) Linder, M. E.; Burr, J. G. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1988**, *85* (8), 2608–2612.
- (139) Zheng, J.; Knighton, D. R.; Xuong, N. H.; Taylor, S. S.; Sowadski, J. M.; Ten Eyck, L. F. *Protein Sci. Publ. Protein Soc.* **1993**, *2* (10), 1559–1573.
- (140) Kathiriya, J. J.; Pathak, R. R.; Clayman, E.; Xue, B.; Uversky, V. N.; Davé, V. *Mol. Biosyst.* **2014**, *10* (11), 2876–2888.
- (141) Lin, H.; Du, J.; Jiang, H.; Begley, T. P. In *Wiley Encyclopedia of Chemical Biology*; John Wiley & Sons, Inc., 2007.
- (142) Butterworth, P. J. *Cell Biochem. Funct.* **1997**, *15* (2), 141–142.
- (143) Selenko, P.; Frueh, D. P.; Elsaesser, S. J.; Haas, W.; Gygi, S. P.; Wagner, G. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2008**, *15* (3), 321–329.
- (144) Stover, D. R.; Liebetanz, J.; Lydon, N. B. *J. Biol. Chem.* **1994**, *269* (43), 26885–26889.
- (145) Pan, Q.; Qiao, F.; Gao, C.; Norman, B.; Optican, L.; Zelenka, P. S. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* **2011**, *68* (20), 3425–3436.
- (146) Obara, Y.; Labudda, K.; Dillon, T. J.; Stork, P. J. S. *J. Cell Sci.* **2004**, *117* (25), 6085–6094.
- (147) Walker, F.; deBlaquiere, J.; Burgess, A. W. *J. Biol. Chem.* **1993**, *268* (26), 19552–19558.
- (148) Means, A. R.; Dedman, J. R. *Nature* **1980**, *285* (5760), 73–77.
- (149) Arbuzova, A.; Murray, D.; McLaughlin, S. *Biochim. Biophys. Acta* **1998**, *1376* (3), 369–379.
- (150) McLaughlin, S.; Murray, D. *Nature* **2005**, *438* (7068), 605–611.
- (151) Brown, M. T.; Cooper, J. A. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Rev. Cancer* **1996**, *1287* (2–3), 121–149.

- (152) Cooper, J. A.; Gould, K. L.; Cartwright, C. A.; Hunter, T. *Science* **1986**, *231* (4744), 1431–1434.
- (153) Zheng, X. M.; Wang, Y.; Pallen, C. J. *Nature* **1992**, *359* (6393), 336–339.
- (154) Cartwright, C. A.; Eckhart, W.; Simon, S.; Kaplan, P. L. *Cell* **1987**, *49* (1), 83–91.
- (155) Piwnica-Worms, H.; Saunders, K. B.; Roberts, T. M.; Smith, A. E.; Cheng, S. H. *Cell* **1987**, *49* (1), 75–82.
- (156) Reynolds, A. B.; Vila, J.; Lansing, T. J.; Potts, W. M.; Weber, M. J.; Parsons, J. T. *EMBO J.* **1987**, *6* (8), 2359–2364.
- (157) Schaller, M. D.; Hildebrand, J. D.; Shannon, J. D.; Fox, J. W.; Vines, R. R.; Parsons, J. T. *Mol. Cell. Biol.* **1994**, *14* (3), 1680–1688.
- (158) Burnham, M. R.; Bruce-Staskal, P. J.; Harte, M. T.; Weidow, C. L.; Ma, A.; Weed, S. A.; Bouton, A. H. *Mol. Cell. Biol.* **2000**, *20* (16), 5865–5878.
- (159) Kim, M.; Tezuka, T.; Tanaka, K.; Yamamoto, T. *Oncogene* **2004**, *23* (9), 1645–1655.
- (160) Li, C.; Liu, M. *FEBS Lett.* **2013**, *587* (8), 1008–1011.
- (161) Prasad, S.; Ravindran, J.; Aggarwal, B. B. *Mol. Cell. Biochem.* **2010**, *336* (1-2), 25–37.
- (162) Sen, R.; Baltimore, D. *Cell* **1986**, *46* (5), 705–716.
- (163) Baldwin, A. S. *Annu. Rev. Immunol.* **1996**, *14* (1), 649–681.
- (164) Hoesel, B.; Schmid, J. A. *Mol. Cancer* **2013**, *12* (1), 86.
- (165) Ghosh, S.; May, M. J.; Kopp, E. B. *Annu. Rev. Immunol.* **1998**, *16*, 225–260.
- (166) Chen, F. E.; Ghost, G. **1999**, *18* (49).
- (167) Chen, F. E.; Huang, D. B.; Chen, Y. Q.; Ghosh, G. *Nature* **1998**, *391* (6665), 410–413.
- (168) Pomerantz, J. L.; Baltimore, D. *Mol. Cell* **2002**, *10* (4), 693–695.
- (169) Osborn, L.; Kunkel, S.; Nabel, G. J. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1989**, *86* (7), 2336–2340.
- (170) Sun, S. C.; Ballard, D. W. *Oncogene* **1999**, *18* (49), 6948–6958.
- (171) Urban, M. B.; Baeuerle, P. A. *Genes Dev.* **1990**, *4* (11), 1975–1984.
- (172) Nolan, G. P.; Ghosh, S.; Liou, H. C.; Tempst, P.; Baltimore, D. *Cell* **1991**, *64* (5), 961–969.
- (173) Beg, A. A.; Ruben, S. M.; Scheinman, R. I.; Haskill, S.; Rosen, C. A.; Baldwin, A. S. *Genes Dev.* **1992**, *6* (10), 1899–1913.
- (174) Gilmore, T. D. *Oncogene* **2006**, *25* (51), 6680–6684.
- (175) Henkel, T.; Machleidt, T.; Alkalay, I.; Krönke, M.; Ben-Neriah, Y.; Baeuerle, P. A. *Nature* **1993**, *365* (6442), 182–185.
- (176) Dixit, V.; Mak, T. W. *Cell* **2002**, *111* (5), 615–619.
- (177) Müller, C. W.; Rey, F. A.; Sodeoka, M.; Verdine, G. L.; Harrison, S. C. *Nature* **1995**, *373* (6512), 311–317.
- (178) Cheng, J. D.; Ryseck, R. P.; Attar, R. M.; Dambach, D.; Bravo, R. *J. Exp. Med.* **1998**, *188* (6), 1055–1062.
- (179) Courtois, G.; Gilmore, T. D. *Oncogene* **2006**, *25* (51), 6831–6843.
- (180) Kang, S.-S.; Woo, S. S.; Im, J.; Yang, J. S.; Yun, C.-H.; Ju, H. R.; Son, C. G.; Moon, E.-Y.; Han, S. H. *Int. Immunopharmacol.* **2007**, *7* (11), 1488–1495.
- (181) Iwanaga, R.; Ozono, E.; Fujisawa, J.; Ikeda, M. A.; Okamura, N.; Huang, Y.; Ohtani, K. *Oncogene* **2008**, *27* (42), 5635–5642.
- (182) Krikos, A.; Laherty, C. D.; Dixit, V. M. *J. Biol. Chem.* **1992**, *267* (25), 17971–17976.
- (183) Karin, M.; Ben-Neriah, Y. *Annu. Rev. Immunol.* **2000**, *18* (1), 621–663.
- (184) Weil, R.; Whiteside, S. T.; Israëil, A. *Immunobiology* **1997**, *198* (1-3), 14–23.

- (185) Whiteside, S. T.; Epinat, J.-C.; Rice, N. R.; Israël, A. *EMBO J.* **1997**, *16* (6), 1413–1426.
- (186) Tergaonkar, V.; Correa, R. G.; Ikawa, M.; Verma, I. M. *Nat. Cell Biol.* **2005**, *7* (9), 921–923.
- (187) Hoffmann, A.; Levchenko, A.; Scott, M. L.; Baltimore, D. *Science* **2002**, *298* (5596), 1241–1245.
- (188) Wu, C.; Ghosh, S. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278* (34), 31980–31987.
- (189) Suyang, H.; Phillips, R.; Douglas, I.; Ghosh, S. *Mol. Cell. Biol.* **1996**, *16* (10), 5444–5449.
- (190) Malek, S.; Huxford, T.; Ghosh, G. *J. Biol. Chem.* **1998**, *273* (39), 25427–25435.
- (191) Mathes, E.; O’Dea, E. L.; Hoffmann, A.; Ghosh, G. *EMBO J.* **2008**, *27* (9), 1357–1367.
- (192) Bennett, V.; Stenbuck, P. J. *J. Biol. Chem.* **1979**, *254* (7), 2533–2541.
- (193) Michaely, P.; Bennett, V. *Trends Cell Biol.* **1992**, *2* (5), 127–129.
- (194) Hacker, H.; Karin, M. *Sci. Signal.* **2006**, *2006* (357), re13.
- (195) Zandi, E.; Rothwarf, D. M.; Delhase, M.; Hayakawa, M.; Karin, M. *Cell* **1997**, *91* (2), 243–252.
- (196) Huynh, Q. K.; Boddupalli, H.; Rouw, S. A.; Koboldt, C. M.; Hall, T.; Sommers, C.; Hauser, S. D.; Pierce, J. L.; Combs, R. G.; Reitz, B. A.; Diaz-Collier, J. A.; Weinberg, R. A.; Hood, B. L.; Kilpatrick, B. F.; Tripp, C. S. *J. Biol. Chem.* **2000**, *275* (34), 25883–25891.
- (197) May, M. J.; D’Acquisto, F.; Madge, L. A.; Glöckner, J.; Pober, J. S.; Ghosh, S. *Science* **2000**, *289* (5484), 1550–1554.
- (198) May, M. J.; Marienfeld, R. B.; Ghosh, S. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277* (48), 45992–46000.
- (199) Woronicz, J. D.; Gao, X.; Cao, Z.; Rothe, M.; Goeddel, D. V. *Science* **1997**, *278* (5339), 866–869.
- (200) Rothwarf, D. M.; Zandi, E.; Natoli, G.; Karin, M. *Nature* **1998**, *395* (6699), 297–300.
- (201) McKenzie, F. R.; Connelly, M. A.; Balzarano, D.; Müller, J. R.; Gelezianas, R.; Marcu, K. B. *Mol. Cell. Biol.* **2000**, *20* (8), 2635–2649.
- (202) Israël, A. *Trends Cell Biol.* **2000**, *10* (4), 129–133.
- (203) Delhase, M.; Hayakawa, M.; Chen, Y.; Karin, M. *Science* **1999**, *284* (5412), 309–313.
- (204) Hayden, M. S.; Ghosh, S. *Genes Dev.* **2004**, *18* (18), 2195–2224.
- (205) Chen, Z.; Hagler, J.; Palombella, V. J.; Melandri, F.; Scherer, D.; Ballard, D.; Maniatis, T. *Genes Dev.* **1995**, *9* (13), 1586–1597.
- (206) Ciechanover, A. *Cell* **1994**, *79* (1), 13–21.
- (207) Tisdale, M. J. *Nat. Rev. Cancer* **2002**, *2* (11), 862–871.
- (208) Pasparakis, M.; Luedde, T.; Schmidt-Supprian, M. *Cell Death Differ.* **2006**, *13* (5), 861–872.
- (209) Kane, J. F. *Curr. Opin. Biotechnol.* **1995**, *6* (5), 494–500.
- (210) Kurland, C.; Gallant, J. *Curr. Opin. Biotechnol.* **1996**, *7* (5), 489–493.
- (211) [http://in-silico.net/tools/biology/sequence\\_conversion](http://in-silico.net/tools/biology/sequence_conversion)
- (212) [http://in-silico.net/tools/biology/sequence\\_conversion](http://in-silico.net/tools/biology/sequence_conversion)
- (213) <http://nihserver.mbi.ucla.edu/RACC/>
- (214) [https://www.snapgene.com/resources/plasmid\\_files/](https://www.snapgene.com/resources/plasmid_files/)
- (215) [www.iba-lifesciences.com/technical-support.html](http://www.iba-lifesciences.com/technical-support.html)
- (216) <http://www.nanodrop.com/>
- (217) Smith, P. K.; Krohn, R. I.; Hermanson, G. T.; Mallia, A. K.; Gartner, F. H.; Provenzano, M. D.; Fujimoto, E. K.; Goeke, N. M.; Olson, B. J.; Klenk, D. C. *Anal. Biochem.* **1985**, *150* (1), 76–85.
- (218) <http://web.expasy.org/protparam/>

- (219) <http://www.idpbynmr.eu/home/>
- (220) Romero, P. *Proteins* **2001**, *42*, 38–48.
- (221) Buratto, R.; Bornet, A.; Milani, J.; Mammoli, D.; Vuichoud, B.; Salvi, N.; Singh, M.; Laguerre, A.; Passemard, S.; Gerber-Lemaire, S.; Jannin, S.; Bodenhausen, G. *ChemMedChem* **2014**, *9* (11), 2509–2515.
- (222) Bodenhausen, G.; Ruben, D. J. *Chem. Phys. Lett.* **1980**, *69* (1), 185–189.
- (223) Pileio, G. *J. Chem. Phys.* **2011**, *135* (17), 174502.
- (224) Liepinsh, E.; Otting, G.; Wüthrich, K. *J. Biomol. NMR* **1992**, *2* (5), 447–465.
- (225) Lane, A. N.; Lefèvre, J. F. *Methods Enzymol.* **1994**, *239*, 596–619.
- (226) <https://scion.duhs.duke.edu/vespa/gamma>
- (227) TGIR-RMN-THC Fr3050 CNRS
- (228) McConnell. *J Chem Phys* **1958**, *28*, 430–431.
- (229) Forsén; Hoffman. *J Chem Phys* **1963**, *39*, 2892–2901.
- (230) Thongwichian, R.; Selenko, P. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* **2012**, *895*, 33–41.
- (231) <http://www.lonza.com/products-services/bio-research/transfection/nucleofector-technology.aspx>
- (232) <http://www.lonza.com/products-services/bio-research/transfection/nucleofector-devices/nucleofector-2b-device.aspx>
- (233) Harrison, C.; Yang, C.; Jindal, A.; DeBerardinis, R. J.; Hooshyar, M. A.; Merritt, M.; Dean Sherry, A.; Malloy, C. R. *NMR Biomed.* **2012**, *25* (11), 1286–1294.
- (234) Tayler, M. C. D.; Marco-Rius, I.; Kettunen, M. I.; Brindle, K. M.; Levitt, M. H.; Pileio, G. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134* (18), 7668–7671.
- (235) Collaboration avec l'équipe de B. Tavitian de l'Hopital Georges Pompidou UMR\_S 970 INSERM
- (236) Halestrap, A. P. *IUBMB Life* **2012**, *64* (1), 1–9.

# **Publications**



## Publications

---

- A. Sadet, L. Fernandes, F. Kateb, R. Balzan, and P. R. Vasos (2014), “Long-lived coherences: Improved dispersion in the frequency domain using continuous-wave and reduced-power windowed sustaining irradiation.” *J. Chem. Phys.* 141, 054203.
- L. Fernandes, A. Sadet, A. Bolopion, Ph. Beaune, G. Bertho, F. Kateb, and P. R. Vasos, (2013), “Hauts champs, pour la RMN des protéines désordonnées et la métabolomique de milieux complexes.” N°295 Pages 42 à 48 - Presse Communication International Spectra analysis
- Fernandes, L., Guerniou, C., Marín-Montesinos, I., Pons, M., Kateb, F. and Vasos, P. R. (2013), “Long-lived states in an intrinsically disordered protein domain.” *Magn. Reson. Chem.*, 51: 729–733.
- S. Cavadini, L. Fernandes, and P.R. Vasos, "Long-Lived States and Coherences for Line Narrowing, DNP, and Study of Interactions", in *eMagRes* (John Wiley & Sons) (2011) <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/9780470034590.emrstm1255/abstract>
- A. Bornet, P. Ahuja, R. Sarkar, L. Fernandes, S. Hadji, S.Y. Lee, A. Haririnia, D. Fushman, G. Bodenhausen, P.R. Vasos, "Long-Lived States to Monitor Protein Unfolding by Proton NMR", *Chemphyschem: A European Journal of Chemical Physics and Physical Chemistry*, 12 (2011), 2729–34. <http://dx.doi.org/10.1002/cphc.201100365>



# Long-lived coherences: Improved dispersion in the frequency domain using continuous-wave and reduced-power windowed sustaining irradiation

A. Sadet,<sup>a)</sup> L. Fernandes,<sup>a)</sup> F. Kateb,<sup>b)</sup> R. Balzan,<sup>b)</sup> and P. R. Vasos

Laboratoire de Chimie et Biochimie Toxicologiques et Pharmacologiques UMR-8601, Université Paris Descartes - CNRS, PRES Paris Sorbonne Cité, 75006 Paris, France

(Received 23 May 2014; accepted 16 July 2014; published online 6 August 2014)

Long-lived coherences (LLC's) are detectable magnetisation modes with favourable relaxation times that translate as sharp resonances upon Fourier transform. The frequency domain of LLC's was previously limited to the range of  $J$ -couplings within pairs of homonuclear spins. LLC evolution at high magnetic fields needs to be sustained by radio-frequency irradiation. We show that LLC-based spectral dispersion can be extended beyond the  $J$ -couplings domain using adapted carrier offsets and introduce a new reduced-power sustaining method to preserve LLC's within the required range of offsets. Spectral resolution is enhanced as the natively narrow lines of LLC's are further dispersed, making them potential probes for the study of biomolecules featuring strong resonance overlap and for media where NMR spectroscopy is commonly hindered by line broadening. © 2014 AIP Publishing LLC. [<http://dx.doi.org/10.1063/1.4891565>]

## INTRODUCTION

Spectral resolution in Nuclear Magnetic Resonance (NMR) is key to distinguish between endogenous substances with closely related chemical structures, between drugs and the products of their metabolism, as well as between different protein sites. The separating power in the frequency domain has direct implications for the identification and quantification of small biomolecules in complex media and for the understanding of protein function. For optimal resolution in NMR, strong magnetic fields are used and the resonances of the nuclei of interest—most often, protons, for sensitivity reasons—are connected to the resonances of heteronuclear species in a second dimension. New perspectives for improving spectral resolution without taking recourse to very strong fields have recently been opened by the extension of magnetisation lifetimes, which leads to narrowing spectral lines. Proton-based magnetisation may afford, provided dispersion is added to line narrowing, sufficient separation between different chemical environments without having to recur to isotopic enrichment, which is necessary for the detection of carbon or nitrogen heteronuclei.

Long-lived states (LLS) in pairs of coupled magnetic nuclei ( $I,S$ ) correspond to the difference between the populations of nuclear singlet states  $S_0 = (|\alpha_1\beta_S\rangle - |\beta_1\alpha_S\rangle)/\sqrt{2}$  and the average population of triplet states,  $T_{+1} = |\alpha_1\alpha_S\rangle$ ;  $T_0 = (|\alpha_1\beta_S\rangle + |\beta_1\alpha_S\rangle)/\sqrt{2}$ ;  $T_{-1} = |\beta_1\beta_S\rangle$ . The singlet and triplet states become eigenstates of a pair of magnetic nuclei in high  $B_0$  field under irradiation by a strong radio-frequency ( $rf$ ) field,  $B_1$ . LLS are insensitive to the intra-pair dipole-

dipole interaction, so their characteristic relaxation time constant,  $T_{LLS}$ , can be much longer than the longitudinal relaxation time of the concerned nuclei,  $T_1$ . Levitt and co-workers showed that nuclear singlet states can be populated in homonuclear two-coupled-spins systems.<sup>1-3</sup> A  $T_{LLS}$  of circa  $37 T_1$  has been obtained in a partially deuterated saccharide,<sup>4</sup> whereas in  $^{15}\text{N}_2\text{O}$  long-lived states have been sustained over tens of minutes.<sup>5</sup> Relaxation rates are sources of contrast for MRI methods, and LLS have been proposed as tracers for MRS and MRI.<sup>6</sup> LLS were found to last five minutes in human blood and can be excited in molecules hyperpolarised either on low-gamma nuclei or on protons.<sup>7-11</sup>

In addition to long-lived states, coherent superpositions of singlet and central triplet states, referred to as long-lived coherences (LLC's),  $Q_{LLC} = (|S_0\rangle\langle T_0| + |T_0\rangle\langle S_0|)/\sqrt{2}$ , can be excited in pairs of coupled spins.<sup>12,13</sup> Long-lived states and singlet-triplet coherences were first observed in very low magnetic fields.<sup>3,14</sup> The use of LLC's relies on their favorable relaxation properties, which can lead to improvements in signal linewidth compared to standard coherences by factors of 3 (for molecules in the fast tumbling regime) and up to 9 (for slowly tumbling molecules in solution), when the dipolar relaxation between the two coupled protons is considered.<sup>12,13</sup> LLC's are insensitive to the presence of inhomogeneities in the main magnetic field,  $B_0$ , as well as to the time variation of such inhomogeneities.<sup>12,15</sup>

However, both LLS and LLC's in high magnetic fields have to be sustained by  $rf$  irradiation,<sup>1</sup> typically under the form of continuous-wave (CW) or composite-pulse decoupling.<sup>16</sup> It was shown that the radiofrequency powers necessary for sustaining these states raise problems, for instance, for applications *in vivo*, as, due to high power dissipation, the specific absorption rate (SAR) limit recommended for human studies is largely exceeded.<sup>17-19</sup> DeVience and co-workers showed that using an RF field applied at an

<sup>a)</sup>A. Sadet and L. Fernandes contributed equally to this work.

<sup>b)</sup>Authors to whom correspondence should be addressed. Electronic addresses: [fatiha.kateb@parisdescartes.fr](mailto:fatiha.kateb@parisdescartes.fr) and [balzan.riccardo@parisdescartes.fr](mailto:balzan.riccardo@parisdescartes.fr). Tel.: +33 1 42 86 38 82. Fax: +33 1 42 86 40 50.

offset  $\Delta\nu_{\text{rf}} = 0$ , i.e., at the average frequency of the four protons signals, with an amplitude of *circa* five times the difference in chemical shift was sufficient to sustain long-lived states.<sup>20</sup>

Many experiments that were so far limited by the longitudinal relaxation time,  $T_1$ , can now be extended to longer timescales using long-lived states. For example, LLS were used to measure slow diffusion coefficients,<sup>21,22</sup> enhance contrast in complex media<sup>23</sup> and proven to be a useful tool to study biological processes such as protein unfolding<sup>24</sup> or ligand-protein interactions.<sup>25</sup> Protein dynamics are conveniently studied by NMR using  $^{15}\text{N}$ -based longitudinal and transverse relaxation rates,  $R_1(^{15}\text{N})$  and  $R_2(^{15}\text{N})$ , as described in the most popular application of the Lipari-Szabo “model-free analysis”,<sup>26,27</sup> or through measurements of the rate constants of cross-correlated relaxation.<sup>28</sup> The introduction of LLC’s and LLS offers new opportunities for the study of biomolecular dynamics using protons. Differentiation between various biomolecular sites is essential in these studies, so  $^1\text{H}$  spectral resolution is critical.<sup>29</sup>

We present the behaviour of LLC as a function of the position of the carrier of sustaining radio-frequency irradiation. LLC-derived dispersion in 2D spectroscopy can be improved by introducing a frequency component depending on the position of the carrier. Under these conditions, a new rf irradiation scheme was introduced, relying on the application of a Carr-Purcell Meiboom-Gill type pulse train<sup>30,31</sup> for windowed sustaining (WS) of LLC’s that reduces the deposited power by a factor 4 compared to CW.<sup>12</sup> We tested the newly introduced experiments on a dipeptide (Alanine-Glycine), as well as on a structured protein (Ubiquitin) and on an intrinsically disordered protein tomain (N-terminal domain of c-Src<sup>32</sup>).

## MATERIALS AND METHODS

Experiments were recorded on a sample of 0.5 M alanine-glycine (Ala-Gly) dipeptide (Figure 1(a)) dissolved in  $\text{D}_2\text{O}$ , as well as on a sample of WT Ubiquitin at a concentration of 2 mM in phosphate buffer at pH = 7, and on a 0.4 mM sample of the uniformly  $^{15}\text{N}$ -labelled N-terminal domain of c-Src at pH = 7.

All NMR spectra of Ala-Gly were recorded on a Bruker spectrometer operating at a proton frequency of 500 MHz, equipped with a 5 mm TXI  $^1\text{H}/^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$  probe. 2D LLC experiments were recorded on Ala-Gly at a temperature of 300 K. CW experiments were recorded using the pulse sequence scheme described in Figure 2(a). A relaxation recovery delay  $\delta_R = 1$  s was used. WS experiments used the pulse sequence scheme described in Figure 2(b). Experiments on WT Ubiquitin were recorded at a temperature  $T = 298$  K, on a spectrometer operating at the proton Larmor frequency of 600 MHz. Spectra were processed using the package XWinNMR. Experiments on c-Src unfolded N-terminal domain were performed on a 0.4 mM sample dissolved in phosphate buffer at pH = 7. Spectra were recorded at 293 K on a spectrometer equipped with a cryoprobe operating at the proton Larmor frequency of 950 MHz.

To calculate contributions of various relaxation mechanisms to the Liouvillian, we considered two protons separated

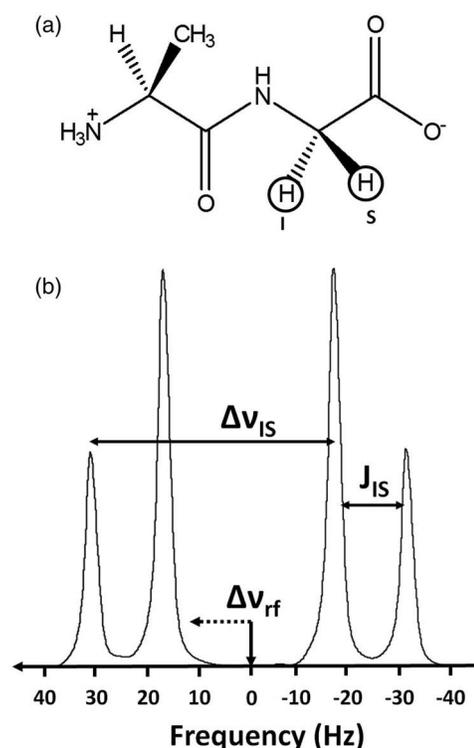


FIG. 1. (a) Structure of Ala-Gly dipeptide. Singlet and triplet states are created on the two diastereotopic protons of the glycine residue (circled) and (b) a 1D  $^1\text{H}$  NMR spectrum of Ala-Gly in the glycine  $H^\alpha$  region. Each of the  $H^\alpha$  protons gives rise to a doublet, whose lines are split by the scalar coupling,  $J_{\text{IS}}$ . Doublets are separated by the chemical shift difference  $\Delta\nu_{\text{IS}}$ .  $\Delta\nu_{\text{rf}}$  represents the offset at which the irradiation frequency is applied. In the case of the two  $H^\alpha$  diastereotopic protons considered  $\Delta\nu_{\text{IS}} = 48$  Hz and  $J_{\text{IS}} = -17.4$  Hz at  $B_0 = 11.74$  T.

by a distance  $|\vec{r}_{\text{IS}}| = 1.74$  Å, and a rotational correlation time  $\tau_c = 8.55$  ps for the molecule. The relaxation rates and evolution frequencies were simulated with GAMMA<sup>33</sup> incorporating coherent evolution under the full spin Hamiltonian considering the measured difference between the chemical shifts,  $\nu_I - \nu_S = 48$  Hz, the scalar coupling  $J_{\text{IS}} = -17.4$  Hz, and a radio-frequency amplitude  $\nu_1 = \gamma_{\text{H}} B_1 / (2\pi) = 800$  Hz, as well as the effects of dipolar relaxation.

The decay of long-lived coherences was fitted to exponential functions using as fitting parameters the initial amplitude, decay rate, oscillation frequency, and baseline offset.

## RESULTS

In Ala-Gly, the two glycine  $H^\alpha$  protons (Figure 1(a)) are chemically inequivalent. The recorded 1D  $^1\text{H}$  NMR spectrum is shown in Figure 1(b). Their signals are doublets with scalar coupling  $J_{\text{IS}} = -17.4$  Hz, separated by  $\Delta\nu_{\text{IS}} = 48$  Hz at  $B_0 = 11.4$  T. Once LLC’s are excited, radio-frequency irradiation has to be used to sustain them, either under the form of a CW sequence (Figure 2(a))<sup>12</sup> or as a WS (Figure 2(b)) reduced-power version.

The sustaining irradiation can be applied on resonance, i.e., at the centre of the spectrum in Figure 1(b), or at different offset frequencies  $\Delta\nu_{\text{rf}}$  with respect to the average frequency

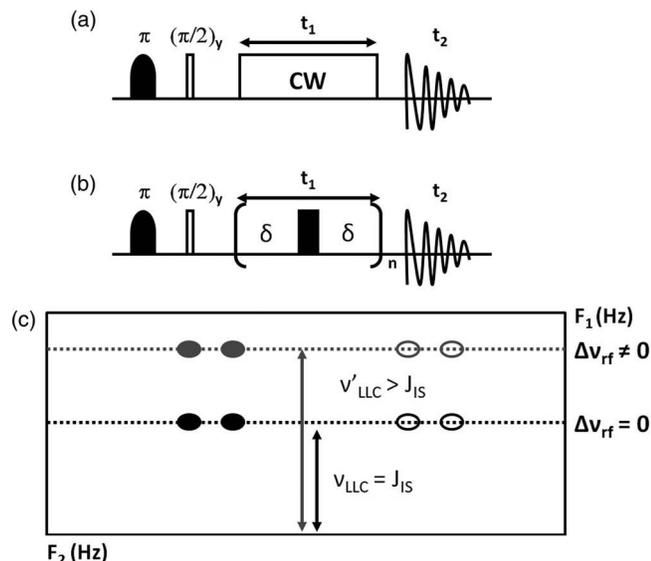


FIG. 2. Pulse sequences used to create and sustain LLC's. A selective  $\pi$  pulse is applied on the lower-frequency doublet, followed by a non-selective  $(\pi/2)_y$  pulse to excite LLC. (a) CW pulse sequence: continuous-wave (CW) irradiation with phase  $x$  is used to sustain LLC's during an evolution time  $t_1$ . Acquisition is performed during  $t_2$ . (b) WS pulse sequence: LLC's are sustained using a WS scheme, where the sequence  $\delta-\pi_x-\delta$  is applied  $n$  times during  $t_1$ . The CW field and the WS non-selective  $\pi_x$ -pulses are applied at  $\Delta\nu_{rf}$  with a nutation frequency  $\nu_1$ . (c) Scheme of the expected 2D spectrum using the pulse sequences described above. The carrier frequency position is indicated by the bold line in the middle of the spectrum. If  $\Delta\nu_{rf} = 0$  Hz, i.e., the  $B_1$  field is applied exactly at the centre of the two doublets, the peak position in the indirect dimension,  $\nu_{LLC}$ , gives an accurate measure of the scalar coupling  $J_{IS}$ . If  $\Delta\nu_{rf} \neq 0$  Hz the evolution frequency is  $\nu'_{LLC} > J_{IS}$ .

of the proton pair signals. The indirect dimension corresponding to the Fourier transform of the  $t_1$  evolution period of a 2D experiment was used to detect LLC's.

Provided the two protons are rendered equivalent in the rotating frame by the amplitude of the  $rf$  field,  $\nu_1$ , applied on resonance ( $\Delta\nu_{rf} = 0$ ) with sufficient amplitude compared to the chemical shift difference between the two coupled nuclei ( $\nu_1 \gg \Delta\nu_{IS}$ , strong irradiation), the evolution of the long-

lived coherence eigenstate Liouville operator  $Q_{LLC}$  is given by<sup>12,13</sup>

$$\frac{d}{dt_1} Q_{LLC} = -(R_{LLC} + i2\pi J_{IS}) Q_{LLC}, \quad (1)$$

where  $R_{LLC} = 1/T_{LLC}$  is the relaxation rate,  $J_{IS}$  is the coupling constant between the two coupled spins considered and  $t_1$  is the indirect-dimension evolution time.

This equation shows that in a 2D experiment recorded under strong-irradiation, the long-lived coherence oscillates with a frequency corresponding to the scalar coupling constant,  $J_{IS}$ , and relaxes with the relaxation time constant  $T_{LLC}$ . On this system, simulations yield  $T_{LLC} = 3.07 T_2$ . Experimentally,  $T_{LLC} = (2.6 \pm 0.2) T_2$  for Ala-Gly under strong irradiation.<sup>34</sup>

If the CW is not applied in the centre of the LLC's spectrum, but rather at an offset  $\Delta\nu_{rf}$  larger than  $\Delta\nu_{IS}$ , then the amplitude of the  $rf$  spin-locking field necessary to efficiently sustain LLC's needs to be increased to fulfil the strong irradiation condition. In our case, for  $\Delta\nu_{rf}$  as high as 250 Hz, the amplitude of the  $rf$  spin-locking field necessary to efficiently sustain LLC's was found to be at least  $\nu_1 = 800$  Hz.

If  $\Delta\nu_{rf} \neq 0$  Hz, Eq. (1) becomes

$$\frac{d}{dt_1} Q'_{LLC} = -(R'_{LLC} + i2\pi\nu'_{LLC}) Q'_{LLC}, \quad (2)$$

where  $Q'_{LLC} \neq Q_{LLC}$  is the LLC Liouvillian eigenstate density operator for off-resonance irradiation. The relaxation time  $T'_{LLC} = 1/R'_{LLC}$  and the evolution frequency  $\nu'_{LLC}$  of  $Q'_{LLC}$  depend on  $B_1$  and  $\Delta\nu_{rf}$  (see Figure 3(a)). From simulations,  $\nu'_{LLC}$  increases with increasing  $|\Delta\nu_{rf}|$ ,  $\nu'_{LLC} > J_{IS}$ . The different resonance frequencies  $\nu'_{LLC}$  as a function of the offset  $\Delta\nu_{rf}$  can be exploited to increase the signal dispersion in the indirect dimension.

The position of the detected resonance in the indirect dimension (Figure 2(c)) increases with increasing  $|\Delta\nu_{rf}|$  for the CW scheme,  $\nu'_{LLC} > J_{IS}$ . The effect is more pronounced for lower  $\nu_1$ . This is mainly due to the mixing in the Liouville eigenstate  $Q_{LLC}$  of single-quantum antiphase and

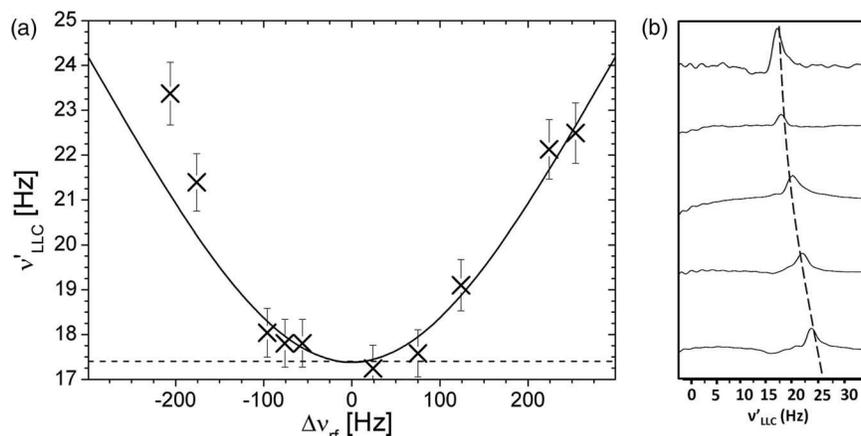


FIG. 3. (a) Indirect-dimension evolution frequency  $\nu'_{LLC}$  for Ala-Gly  $H^\alpha$  protons as a function of the irradiation offset  $\Delta\nu_{rf}$  obtained using the CW pulse sequence in Figure 2(a) with  $\nu_1 = 800$  Hz. Simulation (line) and experimental results ( $\times$ ) and (b) 1D projections of the indirect-dimension spectrum taken at the frequency of the most downfield shifted signal. The offsets are (top to bottom)  $\Delta\nu_{rf} = 24$  Hz, 74 Hz, 124 Hz, 224 Hz, and 254 Hz.

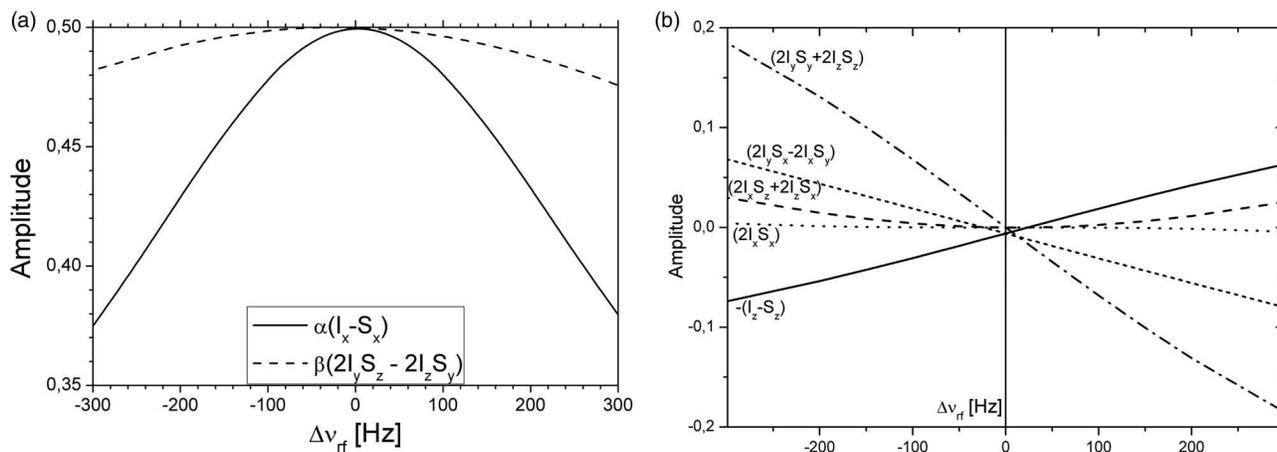


FIG. 4. (a) Amplitude of the main components of the Liouvillian eigenstate density operator corresponding to the LLC's during CW irradiation at different offsets and (b) amplitude of the spurious components of the Liouvillian eigenstate density operator intervening in the structure of LLC's during CW irradiation at different offsets.

double-quantum components and is predicted by exact simulations of the evolution of the spin system under the complete Liouville superoperator. The simulation anticipates symmetric behaviour for negative and positive offsets, and the experimental data (Figures 3(a) and 3(b)) are in good agreement with simulations for positive offsets, while they deviate slightly from the predicted curve for negative offsets, likely due to the perturbation of the Ala resonances upfield of the aliphatic Gly protons. Signal lifetimes, and with them the linewidths of the detected resonances, are predicted to be slightly improved by the change in the offset position, as a result of the admixing of longitudinal and long-lived-type terms. Using CW, the contamination by short-lived  $R_2$ -relaxing states at the end of the sustaining period is lower than 1% for all the offsets used in the present work (Figure 5(b)). However, the experimental situation may differ from this prediction due to the effect of inhomogeneities in the applied transverse magnetic field,  $B_1$ . In our observations, line broadening did not cancel the benefits of the dispersion effect (Figure 3(b)). As the resonance position changes depending on the offset, the spectral dispersion obtained in the indirect dimension is increased.

We analyzed the modifications of the LLC Liouvillian eigenstates for the CW scheme as a function of the offset  $\Delta\nu_{\text{rf}}$  for  $\nu_1 = 800$  Hz. Liouvillian eigenstates corresponding to long-lived coherences are denoted with  $Q_{\text{LLC}}$  and  $Q'_{\text{LLC}}$  for  $\Delta\nu_{\text{rf}} = 0$  and  $\Delta\nu_{\text{rf}} \neq 0$  respectively. Their evolution is given by Eqs. (1) and (2), respectively.

For  $\Delta\nu_{\text{rf}} = 0$  Hz, the eigenstate corresponding to an evolution frequency  $J_{\text{IS}}$  is given by

$$Q'_{\text{LLC}} = [I_x - S_x]/2 + i[2I_y S_z - 2I_z S_y]/2 + \xi \quad (3)$$

where  $I$  and  $S$  are the spin operators corresponding to spin  $I$  and  $S$  and the subscript refers to the operator direction.  $\xi$  represents the residual perturbation and is negligible when  $\nu_1 \gg \Delta\nu_{\text{IS}}$ .

If the CW irradiation is applied off resonance, the eigenstates are increasingly perturbed upon increasing  $\Delta\nu_{\text{rf}}$  and the

eigenstate is modified as follows:

$$Q'_{\text{LLC}} = \alpha[I_x - S_x] + i\beta[2I_y S_z - 2I_z S_y] + \sum \varepsilon_i \Phi_i, \quad (4)$$

where  $\alpha$  and  $\beta$  are amplitudes of the main components of the eigenstate and  $\varepsilon_i$  is the amplitude of the perturbing density operator  $\Phi_i$ . This state evolves with a frequency  $\nu'_{\text{LLC}} > J_{\text{IS}}$  representing the imaginary part of the  $Q'_{\text{LLC}}$  eigenvalue. Both  $\varepsilon_i$  and  $\nu'_{\text{LLC}}$  depend on  $\Delta\nu_{\text{rf}}$ .

Figure 4(a) shows the dependency of the amplitude of  $[I_x - S_x]$ ,  $\alpha$ , which decreases faster than  $\beta$ , the amplitude of  $[2I_y S_z - 2I_z S_y]$  with increasing offset. For large  $\Delta\nu_{\text{rf}}$ , the preparatory part of both CW and WS sequences could lead to important signal losses due to the decreased projection of the  $[I_x - S_x]$  magnetization, prepared by the first two pulses in Figures 2(a) and 2(b), on the eigenstate  $Q'_{\text{LLC}}$ . The amplitudes  $\varepsilon_i$  of spurious states  $\Phi_i$  are shown in Figure 4(b). The main perturbation is due to the  $[2I_y S_y + 2I_z S_z]$  state. The amplitude ratio between the observable  $R_2$ -relaxing state  $[I_x + S_x]$  and the LLC's state  $[I_x - S_x]$  at the end of the sustaining period is shown in Figure 5(b). The low value shows how the contamination of  $R_2$ -relaxing states remains negligible even for large offsets for both CW and WS sequences.

We tested several WS sequences (Figure 2(b)) with different delays  $\delta$  to produce sustaining schemes with an irradiation power as low as possible compared to the CW scheme. We experimentally found 800 Hz as the lowest CW amplitude necessary to obtain signals upon application of carrier offsets of up to 250 Hz. In the WS scheme, the sequence  $\delta$ - $\pi_x$ - $\delta$  is repeated  $n$  times during  $t_1$ , where  $\delta$  is the constant delay used and the duration of the  $\pi$  pulse with a phase opposed to the excitation pulse is  $\tau_\pi = \pi/(\gamma_H B_1)$ . The average power delivered to the sample is reduced, compared to a CW scheme with the same  $B_1$ , by a fraction of  $\tau_\pi/(\tau_\pi + 2\delta)$ . During the non negligible evolution time without irradiation, the LLC contamination by  $R_2$ -relaxing states remains below 2% for a relative power of 25% (Figure 5(b)).

Figure 5(a) shows the behaviour of the indirect-dimension evolution frequency  $\nu_{\text{LLC}}^{\text{WS}}$  and lifetimes  $T_{\text{LLC}}^{\text{WS}}$

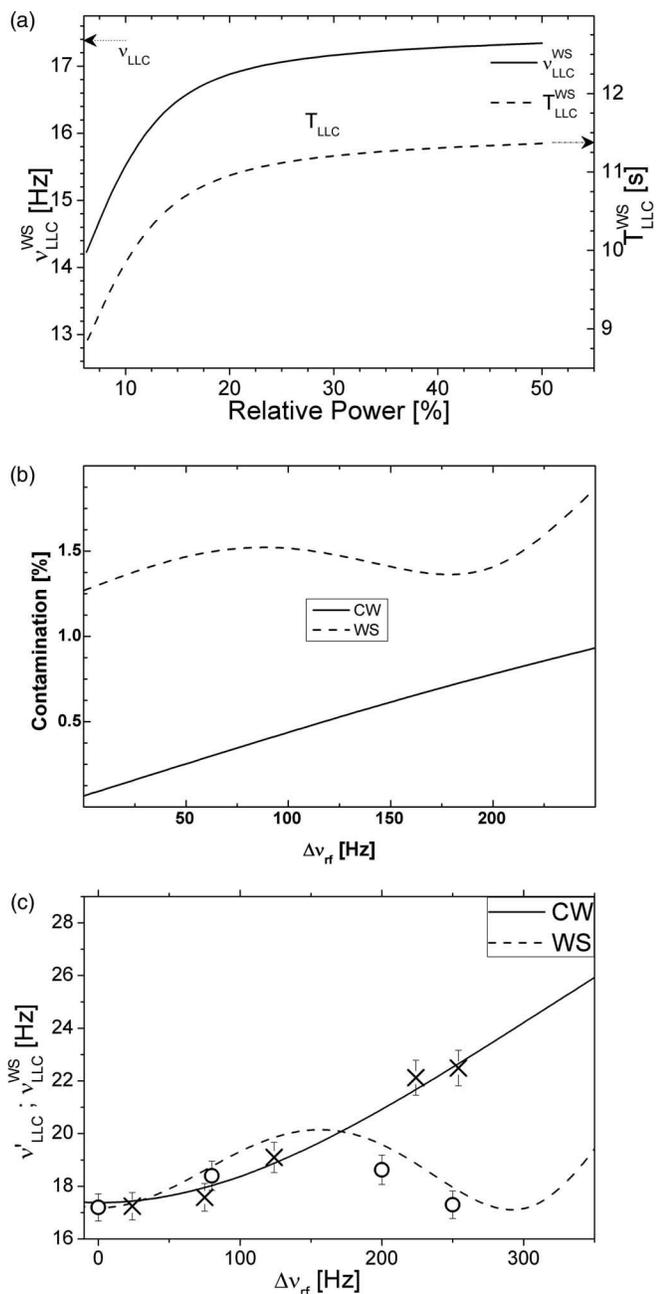


FIG. 5. (a) Indirect-dimension evolution frequency  $\nu_{LLC}^{WS}$  (solid line) and LLC relaxation time  $T_{LLC}^{WS}$  (dashed line) as a function of average power delivered to the sample relative to the CW scheme, for WS scheme at  $\Delta\nu_{rf} = 0$  and  $\nu_1 = 800$  Hz. For comparison, the values of  $\nu_{LLC}$  and  $T_{LLC}$  using CW with  $\nu_1 = 800$  Hz are marked with arrows; and (b) amplitude ratio of  $R_2$ -relaxing and LLC-relaxing states in the LLC eigenvectors. This quantity gives an estimation of the contribution from  $R_2$ -relaxing states to the relaxation of LLC's eigenstates. (c) Comparison of  $\nu_{LLC}^{WS}$  and  $\nu_{LLC}^{WS}$  as a function of  $\Delta\nu_{rf}$  for CW scheme and for WS scheme at 25% power (i.e.,  $\delta = 937.5 \mu s = 1.5\tau_r$ ) and  $\nu_1 = 800$  Hz; lines represent simulation data on CW scheme (solid) and WS scheme (dashed); symbols represent experimental results for CW scheme (crosses) and WS scheme (circles).

produced by the WS scheme as a function of the relative power when the  $\pi$ -pulse nutation frequency is fixed at  $\nu_1 = 800$  Hz and the evolution delay  $\delta$  between  $\pi$ -pulses increases, at  $\Delta\nu_{rf} = 0$  Hz. For relative powers higher than 25% of that used in the CW sequence, the WS scheme yields

relaxation time constants and evolution frequencies similar to CW. The criterion used to choose a relative power of 25% consists in ensuring that both  $\nu_{LLC}^{WS}$  and  $T_{LLC}^{WS}$  differ by less than 5% from  $\nu_{LLC}'$  and  $T_{LLC}'$ , respectively, at  $\Delta\nu_{rf} = 0$  Hz.

Finally, we compared the spectral dispersion induced using CW irradiation with the one obtained using WS as a function of the offset  $\Delta\nu_{rf}$ , at 25% relative power (Figure 5(c)). The results show that the behaviour of  $\nu_{LLC}^{WS}$  is not monotone but has a maximum at  $\Delta\nu_{rf} \sim 150$  Hz and a minimum at  $\Delta\nu_{rf} \sim 300$  Hz. Therefore, using a windowed sustaining (WS) sequence for LLC's, in place of CW, we obtain comparable decay time constants and spectral dispersions, with a lower power delivered to the sample. Although now diminished, the deposited power is still above SAR limitations.

Although a non-monotone resonance shift curve is less straightforward for separating signals in the indirect dimension, the comparison shows that the WS scheme produces a larger dispersion for offsets  $\Delta\nu_{rf} < 125$  Hz. The experimental results are consistent with simulations (Figure 5(c)).

The different indirect-dimension evolution frequencies between glycine residues with different average chemical shifts but very similar  $J$ -couplings improve the separation of signals which may be close in the direct dimension spectra. The spectral dispersion can be as high as  $\Delta\nu_{LLC}' = 0.03 \Delta\nu_{rf}$  at  $B_0 = 11.74$  T for a CW amplitude  $\nu_1 = 800$  Hz (Figure 6(a)). As an example of the potential application of the technique we show in Figure 6(b) the simulated 2D spectrum of two Glycines that are not resolved in the direct dimension (1D projection on top). The aliphatic protons of the two glycines have the same scalar coupling,  $J = -17.4$  Hz, but different chemical shifts. This last characteristic is exploited in a WS-LLC sequence with rf irradiation at  $\Delta\nu_{rf} = 63$  Hz and  $\Delta\nu_{rf} = 83$  Hz for the two glycines respectively to separate the signals in the indirect dimension. The indirect dimension separation then allows the unambiguous distinction of proton pairs, rendering assignment possible.

We tested experimentally the CW sequence on human Ubiquitin with  $\nu_1 = 600$  Hz applied at 3.82 ppm, corresponding to a  $\Delta\nu_{rf} = 0$  Hz for Gly-75 and  $\Delta\nu_{rf} \approx 100$  Hz for Gly-76. Residues Gly-75 and Gly-76 (Figure 6(c)-inset) have very similar couplings  $J_{IS} \sim 17$  Hz for the two diastereotopic  $H^\alpha$  protons. Previous LLC experiments yielded evolution frequencies in the indirect dimension  $\nu_{LLC}(\text{Gly-75}) = 16.8$  Hz and  $\nu_{LLC}(\text{Gly-76}) = 17.2$  Hz, respectively.<sup>13</sup> Using the improved dispersion stemming from the carrier offset under reduced rf power CW, these resonances can now be resolved in the indirect dimension (Figure 6(c)), and their frequency separation is in agreement with simulations.

A preliminary study on the c-Src intrinsically disordered N-terminal domain, which features low-resolution 1D proton spectra, showed that Gly signals in the crowded  $^1H$  region 3.6–4.0 ppm could be dispersed to different degrees in 2D LLC spectroscopy following the application of a selective  $180^\circ$  pulse at 3.78 ppm and CW irradiation using two amplitudes  $\nu_1 = 800$  Hz and  $\nu_1 = 1520$  Hz (Figure 6(d)).

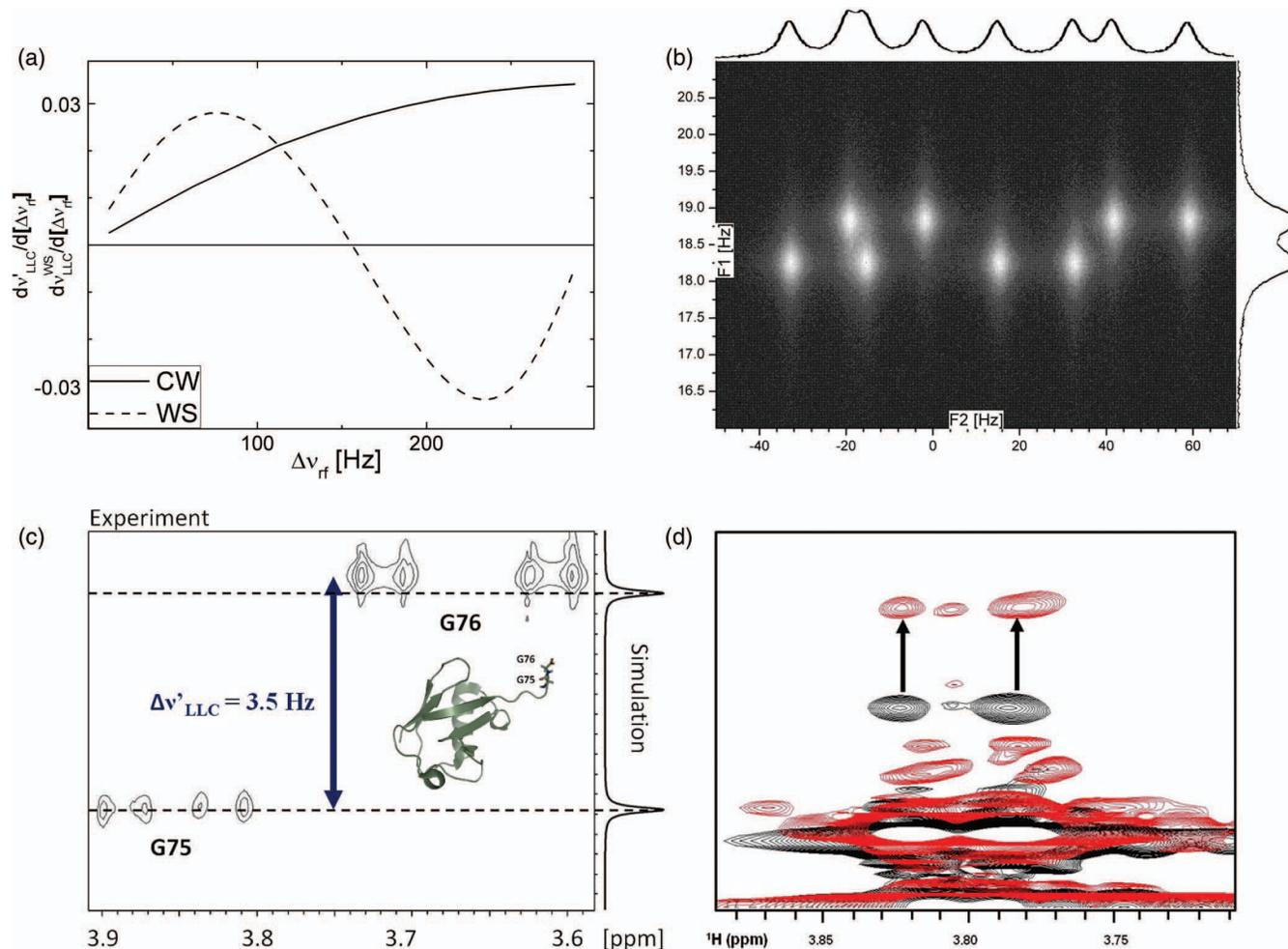


FIG. 6. (a) First derivative of  $\nu'_{\text{LLC}}$  (solid line) and  $\nu_{\text{LLC}}^{\text{WS}}$  (dashed line) with respect to  $\Delta\nu_{\text{rf}}$  as a function of  $\Delta\nu_{\text{rf}}$  illustrating the expected improvement in resolution. (b) Simulated 2D spectrum of a couple of Glycine diastereotopic proton pairs with average chemical shift difference of 20 Hz. The spectrum was obtained with a WS sequence at  $\nu_1 = 800$  Hz and 25% relative power at  $\Delta\nu_{\text{rf}} = 63$  Hz for the first and  $\Delta\nu_{\text{rf}} = 86$  Hz for the second Glycine. The signals originating from each proton pair are incompletely resolved in the direct dimension (spectrum above the figure) but well separated in the indirect dimension of the 2D spectrum allowing unambiguous signal assignment. (c) 2D LLC spectrum recorded on a spectrometer operating at 600 MHz, using the pulse sequence described in Figure 2(a), with the carrier set at 3.82 ppm, corresponding to a  $\Delta\nu_{\text{rf}} = 0$  Hz for Gly-75, and  $\Delta\nu_{\text{rf}} \approx 100$  Hz for Gly-76. The  $J_{\text{IS}}$  values are  $J_{\text{IS}} \approx 17$  Hz for both residues. On the right side of the 2D spectrum, the simulated 1D indirect-dimension spectrum is shown and dashed lines indicate the predicted  $\nu'_{\text{LLC}}$ . The two experimental signals are well resolved in the indirect dimension, with a  $\Delta\nu'_{\text{LLC}}(\text{exp}) = 3.5$  Hz, in good agreement with the value predicted by simulations,  $\Delta\nu'_{\text{LLC}}(\text{sim}) = 3.2$  Hz. (d) 2D LLC spectroscopy in the Gly region of the disordered N-terminal domain of c-Src using CW rf sustaining with amplitudes  $\nu_{1a} = 1520$  Hz (black) and  $\nu_{1b} = 800$  Hz (red) at  $B_0 = 22.3$  T (950 MHz proton Larmor frequency). The carrier was set to 4.08 ppm, corresponding to a  $\Delta\nu_{\text{rf}} \approx 247$  Hz for the observed shifted signals.

## CONCLUSION

This study shows that improved dispersion can be obtained in LLC spectroscopy. LLC's have the potential to differentiate between target molecules with similar structures or among amino-acids in proteins in very similar environments. The method may find applications in the study of disordered protein domains, where the limited 1D  $^1\text{H}$  spectral resolution hinders signal assignment.

## ACKNOWLEDGMENTS

The authors are very grateful to Mariano Maffei and Miquel Pons from the University of Barcelona, Spain, for the sample of c-Src N-terminal domain. This research was supported by a DIM Analytics/Ile de France contract via a PhD

grant to LF, by the Université Paris Descartes and the Paris Sorbonne Cité IdEx program, the French CNRS, and the Fondation de la Recherche Médicale, FRM ING20130526708. We acknowledge the TGIR-RMN-THC Fr3050 CNRS for NMR measurement time.

- <sup>1</sup>M. Carravetta and M. H. Levitt, *J. Am. Chem. Soc.* **126**, 6228 (2004).
- <sup>2</sup>M. Carravetta and M. H. Levitt, *J. Chem. Phys.* **122**, 214505 (2005).
- <sup>3</sup>M. Carravetta, O. G. Johannessen, and M. H. Levitt, *Phys. Rev. Lett.* **92**, 153003 (2004).
- <sup>4</sup>R. Sarkar, P. R. Vasos, and G. Bodenhausen, *J. Am. Chem. Soc.* **129**, 328 (2007).
- <sup>5</sup>G. Pileio, M. Carravetta, E. Hughes, and M. H. Levitt, *J. Am. Chem. Soc.* **130**, 12582 (2008).
- <sup>6</sup>R. K. Ghosh, S. J. Kadlecik, J. H. Ardenkjaer-Larsen, B. M. Pullinger, G. Pileio, M. H. Levitt, N. N. Kuzma, and R. R. Rizi, *Magn. Reson. Med.* **66**, 1177 (2011).
- <sup>7</sup>P. Ahuja, R. Sarkar, S. Jannin, P. R. Vasos, and G. Bodenhausen, *Chem. Commun.* **46**, 8192 (2010).

- <sup>8</sup>J. H. Ardenkjaer-Larsen, B. Fridlund, A. Gram, G. Hansson, L. Hansson, M. H. Lerche, R. Servin, M. Thaning, and K. Golman, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **100**, 10158 (2003).
- <sup>9</sup>M. C. D. Tayler, I. Marco-Rius, M. I. Kettunen, K. M. Brindle, M. H. Levitt, and G. Pileio, *J. Am. Chem. Soc.* **134**, 7668 (2012).
- <sup>10</sup>W. S. Warren, E. Jenista, R. T. Branca, and X. Chen, *Science* **323**, 1711 (2009).
- <sup>11</sup>E. Vinogradov and A. K. Grant, *J. Magn. Reson.* **194**, 46 (2008).
- <sup>12</sup>R. Sarkar, P. Ahuja, P. R. Vasos, and G. Bodenhausen, *Phys. Rev. Lett.* **104**, 053001 (2010).
- <sup>13</sup>R. Sarkar, P. Ahuja, P. R. Vasos, A. Bornet, O. Wagnieres, and G. Bodenhausen, *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* **59**, 83 (2011).
- <sup>14</sup>G. Pileio, M. Carravetta, and M. H. Levitt, *Phys. Rev. Lett.* **103**, 083002 (2009).
- <sup>15</sup>S. Chinthalapalli, A. Bornet, T. F. Segawa, R. Sarkar, S. Jannin, and G. Bodenhausen, *Phys. Rev. Lett.* **109**, 047602 (2012).
- <sup>16</sup>R. Sarkar, P. Ahuja, D. Moskau, P. R. Vasos, and G. Bodenhausen, *ChemPhysChem* **8**, 2652 (2007).
- <sup>17</sup>G. Pileio and M. H. Levitt, *J. Chem. Phys.* **130**, 214501 (2009).
- <sup>18</sup>P. Bottomley, R. Redington, W. Edelstein, and J. Schenck, *Magn. Reson. Med.* **2**, 336 (1985).
- <sup>19</sup>T. Theis, Y. Feng, T. Wu, and W. S. Warren, *J. Chem. Phys.* **140**, 014201 (2014).
- <sup>20</sup>S. J. DeVience, R. L. Walsworth, and M. S. Rosen, *J. Magn. Reson.* **218**, 5 (2012).
- <sup>21</sup>P. Ahuja, R. Sarkar, P. R. Vasos, and G. Bodenhausen, *J. Am. Chem. Soc.* **131**, 7498 (2009).
- <sup>22</sup>S. Cavadini and P. R. Vasos, *Concepts Magn. Reson., Part A* **32A**, 68 (2008).
- <sup>23</sup>S. J. DeVience, R. L. Walsworth, and M. S. Rosen, *NMR Biomed.* **26**, 1204 (2013).
- <sup>24</sup>A. Bornet, P. Ahuja, R. Sarkar, L. Fernandes, S. Hadji, S. Y. Lee, A. Haririnia, D. Fushman, G. Bodenhausen, and P. R. Vasos, *ChemPhysChem* **12**, 2729 (2011).
- <sup>25</sup>N. Salvi, R. Buratto, A. Bornet, S. Ulzega, I. R. Rebollo, A. Angelini, C. Heinis, and G. Bodenhausen, *J. Am. Chem. Soc.* **134**, 11076 (2012).
- <sup>26</sup>G. Lipari and A. Szabo, *J. Am. Chem. Soc.* **104**, 4546 (1982).
- <sup>27</sup>G. Lipari and A. Szabo, *J. Am. Chem. Soc.* **104**, 4559 (1982).
- <sup>28</sup>R. Bruschweiler and R. Ernst, *J. Chem. Phys.* **96**, 1758 (1992).
- <sup>29</sup>L. Fernandes, C. Guerniou, I. Marin-Montesinos, M. Pons, F. Kateb, and P. R. Vasos, *Magn. Reson. Chem.* **51**, 729 (2013).
- <sup>30</sup>H. Carr and E. Purcell, *Phys. Rev.* **94**, 630 (1954).
- <sup>31</sup>S. Meiboom and D. Gill, *Rev. Sci. Instrum.* **29**, 688 (1958).
- <sup>32</sup>Y. Pérez, M. Gairí, M. Pons, and P. Bernadó, *J. Mol. Biol.* **391**, 136 (2009).
- <sup>33</sup>S. A. Smith, T. O. Levante, B. H. Meier, and R. R. Ernst, *J. Magn. Reson. A* **106**, 75 (1994).
- <sup>34</sup>P. Mievilleville, P. Ahuja, R. Sarkar, S. Jannin, P. R. Vasos, S. Gerber-Lemaire, M. Mishkovsky, A. Comment, R. Gruetter, O. Ouari, P. Tordo, and G. Bodenhausen, *Angew. Chem., Int. Ed.* **49**, 6182 (2010).





L. FERNANDES<sup>1</sup>, A. SADET<sup>1</sup>, A. BOLOPION<sup>2</sup>, PH. BEAUNE<sup>2</sup>, G. BERTHO<sup>1</sup>, F. KATEB<sup>1\*</sup>, AND P. R. VASOS<sup>1\*</sup>

## Hauts champs, pour la RMN des protéines désordonnées et la métabolomique de milieux complexes

### RÉSUMÉ

L'intensité du champ magnétique principal est déterminante pour la sensibilité et la résolution des mesures RMN. Si, concernant la sensibilité de la détection, des développements récents impliquant l'utilisation de l'effet de la polarisation dynamique nucléaire promettent de contourner la nécessité d'utiliser de très hauts champs, la résolution spectrale continue à requérir des champs élevés. Une bonne résolution reste critique pour étudier les protéines qui présentent des conformations multiples, ainsi que pour les milieux complexes constitués de plusieurs centaines de molécules, tels que les milieux biologiques. Des expériences RMN nouvelles, qui fonctionnent de manière optimale à très hauts champs, sont proposées ici pour les études de protéines intrinsèquement désordonnées, qui ont, typiquement, une faible dispersion spectrale. Ces expériences font intervenir des états à longs temps de vie (*long-lived states* ou LLS) dans des expériences bidimensionnelles (LLS-HSQC). Pour les milieux complexes, la métabolomique par RMN permet d'associer une empreinte caractéristique aux échantillons appartenant à différentes classes. Une bonne résolution est essentielle pour distinguer les différentes empreintes.

### MOTS-CLÉS

RMN, Très hauts champs, Protéines désordonnées, Métabolomique

### High field NMR for disordered proteins and metabolomics of complex media

### SUMMARY

The magnitude of the main magnetic field is crucial for the sensitivity and resolution of NMR measurements. If, for sensitivity, recent developments involving the use of dynamic nuclear polarization promise to bypass the use of very high fields, the spectral resolution continues to require strong NMR magnets. Resolution is critical for studying the proteins that have multiple conformations, as well as for complex media consisting of several hundred molecules, such as biological media. New NMR experiments, which work best at very high fields, are described here for studies of intrinsically disordered proteins, which typically have a low spectral dispersion. These experiments rely on the use of Long-lived states (LLS) in 1D or 2D versions. In the latter, referred as LLS-HSQC, a second dimension is added, which allows for the evolution of backbone <sup>15</sup>N chemical shifts of residues involved. For complex media, the metabolomics approach allows to combine NMR characteristic fingerprint to samples belonging to different classes. A good resolution is essential to distinguish between different fingerprints.

### KEYWORDS

NMR, very high fields, Metabolomics, Intrinsically Disordered Proteins, Long Lived states, Long Lived Coherences

### I - Introduction

La résonance magnétique nucléaire (RMN) est une méthode de choix dans l'étude des biomolécules, permettant d'avoir accès à des informations structurales et dynamiques. Par rapport au champ magnétique terrestre, les champs principaux utilisés en RMN sont plusieurs millions de fois plus intenses. L'aimant le plus puissant disponible à ce jour, a un champ

principal  $B_0 = 23,5$  T (1000 MHz). Pour créer ces champs intenses, les circuits supraconducteurs utilisés nécessitent une température proche du zéro absolu, soit  $T = -269,15$  °C, qui est obtenue en recourant à l'hélium liquide. Autour de la chambre de l'aimant contenant l'hélium, un espace rempli d'azote liquide permet de réduire la différence de température avec l'extérieur et de limiter l'évaporation de l'hélium. Dans le champ magnétique principal, souvent orienté selon la

<sup>1</sup> Équipe de RMN, Laboratoire de Chimie et Biochimie Pharmacologiques et Toxicologiques, UMR 8601, FR C2T2S, Université Paris Descartes CNRS, PRES Paris Sorbonne Cité. 45, rue des Saints-Pères. 75006 Paris.

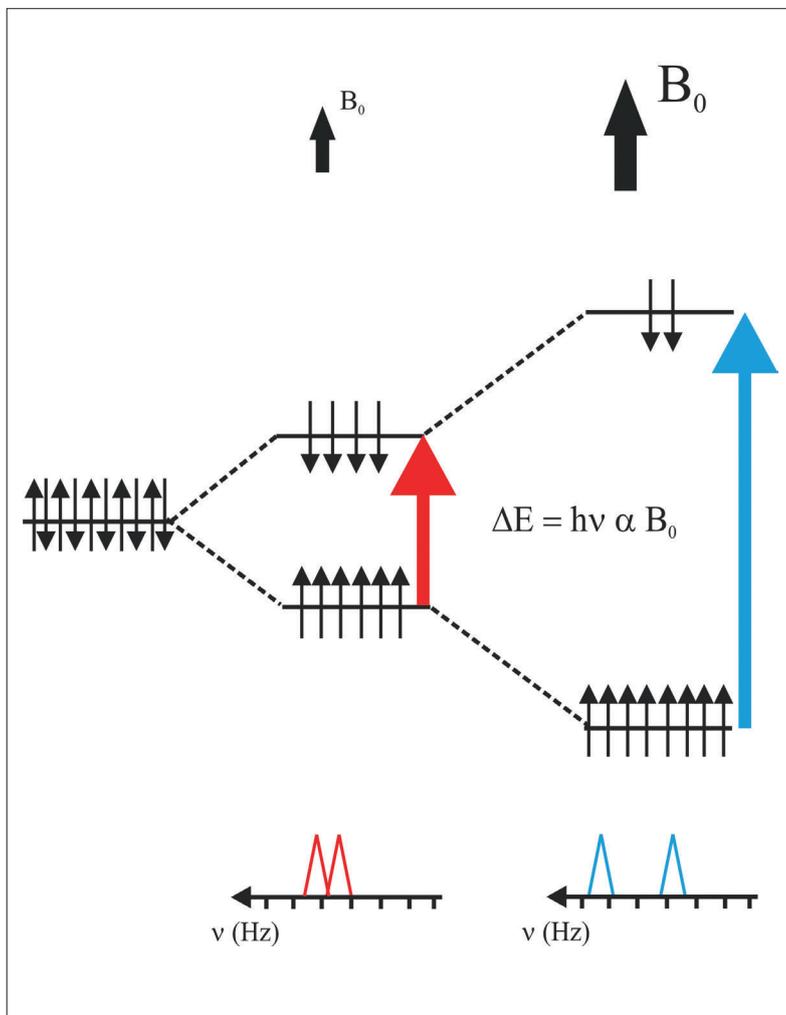
<sup>2</sup> Équipe «Bases moléculaires de la réponse aux xénobiotiques», Inserm UMRS 775, Université Paris Descartes CNRS PRES Paris Sorbonne Cité. 45, rue des Saints-Pères. 75006 Paris.

\*Email : fatiha.kateb@parisdescartes.fr, paul.vasos@parisdescartes.fr

verticale, les moments magnétiques des noyaux ont des orientations quantifiées le long de l'axe du champ, et les populations de ces orientations atteignent un équilibre statistique. Pour les protons, qui possèdent un spin nucléaire  $\frac{1}{2}$ , le moment magnétique nucléaire peut assumer les états 'up' ou 'down'.

La polarisation  $P = (P_{up} - P_{down}) / (P_{up} + P_{down})$  qui s'établit dépend des populations  $P_{up,down}$  de ces états et conditionne la sensibilité de la mesure (Figure 1). L'aimantation  $M_0$  résultant de la polarisation d'un ensemble de moments magnétiques nucléaires  $\frac{1}{2}$  à l'équilibre, est alignée le long de  $B_0$  et a la valeur absolue :

$$(1)$$



**Figure 1**

Haut : Levée de dégénérescence des niveaux d'énergie d'un noyau de spin  $I=1/2$ , soumis à un champ  $B_0$ . L'écart d'énergie entre les niveaux 'up' et 'down' dépend de l'intensité du champ appliqué. La sensibilité peut ainsi être améliorée en utilisant des champs magnétiques plus intenses. Bas : Spectres en fréquence obtenus pour deux sites moléculaires différents, en plaçant l'échantillon dans un champ magnétique faible (rouge) ou élevé (bleu). Ces sites résonnent à des fréquences  $\nu_1 = \nu_0 + \sigma_1$  et  $\nu_2 = \nu_0 + \sigma_2$ ,  $\sigma$  étant la constante d'écran propre à chaque site moléculaire. Deux signaux résonnant à des fréquences  $\nu_1, \nu_2$  proches peuvent ainsi être mieux séparés à plus haut champ. On parle alors de gain en résolution.

où  $N = P_{up} + P_{down}$  représente le nombre total de noyaux magnétiques;  $\gamma$ , le rapport gyromagnétique du noyau considéré en  $s^{-1} \cdot T^{-1}$ ;  $h$ , la constante de Planck réduite en J.s;  $B_0$  le champ magnétique principal en T;  $k_B$ , la constante de Boltzmann en  $J \cdot K^{-1}$ , et  $T$  la température en K.[1]

Au-delà du champ magnétique principal, l'aimantation de départ peut être amplifiée grâce à des techniques d'hyperpolarisation.[2-5] La polarisation dynamique nucléaire (*Dynamic Nuclear Polarisation*, DNP) [6-11] est une technique d'hyperpolarisation qui améliore significativement l'intensité des signaux (jusqu'à un facteur  $10^4$  quand la dissolution est utilisée pour amener les molécules polarisées à l'état liquide). La RMN devient alors compétitive en sensibilité avec des spectroscopies à plus haute énergie et ceci permet d'envisager de nouvelles applications. La DNP repose sur l'utilisation d'électrons non-appariés à partir desquels l'énergie nécessaire à la polarisation du noyau est transférée. Un ajout d'agents radicalaires est nécessaire pour l'expérience, et une irradiation continue de ces radicaux aux fréquences électroniques (*i.e.*, micro-ondes) est utilisée pour construire la polarisation nucléaire.

L'aimantation (1) établie à l'équilibre thermique ou hyperpolarisée en utilisant la DNP, permet d'accéder à des informations sur l'environnement chimique des noyaux d'intérêt. Pour cela, on applique une impulsion de radiofréquence qui va perturber l'équilibre du système. Après cette impulsion, on enregistre l'interférogramme (*Free Induction Decay* ou FID) créée lors du retour à l'équilibre. À partir de l'interférogramme, on accède, après transformée de Fourier, aux fréquences de résonance (en Hz) qui caractérisent l'environnement chimique du noyau concerné. Une dispersion spectrale suffisante entre sites moléculaires différents est nécessaire pour obtenir des informations distinctes concernant ces sites. Si la différence de fréquence  $\Delta\nu$  entre deux sites est plus grande que leurs largeurs de raies respectives, les deux signaux correspondants sont bien résolus (Figure 1).

L'avantage de l'étude RMN impliquant des hétéronoyaux (noyaux différents du proton, dont les rapports gyromagnétiques sont faibles, tels que l'azote-15 ou le carbone-13) réside dans la possibilité d'éclater l'information spectrale selon d'autres dimensions (RMN bidimensionnelle 2D, RMN tridimensionnelle 3D). L'analyse RMN 2D contribue à résoudre les problèmes liés aux recouvrements de signaux typiquement observés dans les spectres 1D, en particulier lorsque la molécule étudiée est complexe comme dans le cas de bio-macromolécules (protéines, acides nucléiques) ou de milieux biologiques complexes constitués d'un grand nombre de molécules. La liste des applications RMN qui peuvent être améliorées en utilisant un champ principal très

## Hauts champs pour la RMN des protéines désordonnées et la métabolomique de milieux complexes

intense est longue, allant de l'étude de structures des bio-macromolécules [12] jusqu'au suivi par RMN des phénomènes dynamiques sur différentes échelles de temps.[13-15] Deux exemples sont ici présentés où l'utilisation de hauts champs rend possibles de nouvelles expériences sur des protéines désordonnées et aide à distinguer, en RMN métabolomique, les empreintes des milieux biologiques complexes issus des cultures cellulaires.

### II - Expériences 2D pour l'étude de la relaxation RMN

L'expérience 2D-HSQC (*Heteronuclear Single Quantum Correlation Spectroscopy*) est classiquement utilisée en RMN [16, 17]. Elle corrèle le noyau  $^1\text{H}$  à l'hétéroatome directement lié (par exemple, le carbon-13 ou l'azote-15). Cette procédure est couramment utilisée pour obtenir une deuxième dimension et pour améliorer la résolution spectrale. L'aimantation du proton est transférée à l'hétéronoyau via une séquence d'impulsions appelée INEPT (*Insensitive Nuclei Enhanced by Polarization Transfer*). On obtient alors une information sur le déplacement chimique de l'hétéronoyau, puis on revient sur le proton que l'on détecte. L'intensité du signal en RMN est proportionnelle au rapport gyromagnétique du noyau excité et détecté, d'où l'intérêt de partir du proton, qui possède un rapport gyromagnétique important, et d'y retourner pour le détecter. Si l'hétéronoyau associé est l'azote, on obtient un spectre bidimensionnel, dont une dimension reflète les déplacements chimiques du proton lié à l'azote et l'autre dimension les déplacements chimiques de l'azote. Le spectre résultant présente un signal de corrélation pour chaque paire  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ . Le gain de résolution résultant de cette procédure peut être bénéfique pour des expériences qui jusqu'ici utilisaient exclusivement les protons, comme celles décrites ci-dessous.

À l'état liquide, le retour à l'équilibre de l'aimantation des noyaux, *i.e.*, la relaxation nucléaire, dépend fortement des mouvements moléculaires. Pour les noyaux  $^1\text{H}$ , la principale source de relaxation sont les couplages dipôle-dipôle moyennés par les mouvements moléculaires. Le transfert d'aimantation des protons vers les hétéronoyaux qui relaxent généralement moins vite,[18, 19] permet de conserver l'aimantation sur de longues durées et de suivre des phénomènes dynamiques lents. L'équilibrage des différences de population entre les états propres de Zeeman est caractérisée par la constante de relaxation « longitudinale »,  $T_1$ . Dans le cas des spins  $\frac{1}{2}$ , cette relaxation est principalement issue des interactions dipôle-dipôle entre les moments magnétiques.

On associe le nom d'états à longs temps de vie (*Long-Lived States* ou LLS) aux surplus ou déficits de populations sur des configurations de spins de

noyaux couplés avec des symétries avantageuses pour la relaxation. Ces états, qui peuvent avoir une structure complexe dans le cas de trois ou plusieurs noyaux couplés, sont associés, pour des paires de spins, aux singulets nucléaires, et leur utilité découle de leurs constantes de temps de relaxation qui peuvent être des dizaines de fois plus longues que  $T_1$ .[20-22] Ce retour lent à l'équilibre, qui rappelle le phénomène de phosphorescence, provient du fait que les LLS sont insensibles au couplage dipôle-dipôle entre les moments magnétiques nucléaires concernés. Les états à longs temps de vie ont montré leur utilité dans l'étude du dépliement des protéines.[23] Ils représentent également, par leur relaxation lente, une cible privilégiée permettant de maintenir plus longtemps la polarisation augmentée provenant des expériences mettant en jeu la DNP.[24, 25] Les LLS peuvent être générés à partir d'un système de protons diastéréotopes, tels que ceux existant dans les unités des glycines et des sérines d'une protéine.

Il a été démontré que l'aimantation transverse, tout comme l'aimantation longitudinale lors de la création de LLS, peut être distribuée sur des noyaux couplés de manière à augmenter son temps de relaxation caractéristique. Cette aimantation prend alors la forme de cohérences à longs temps de vie (*Long-Lived Coherences* ou LLC).[26] Les LLC permettent de réduire la largeur des lignes spectrales, donnant la possibilité d'améliorer la résolution au-delà de l'effet de l'intensité du champ magnétique principal.

### III - Études métaboliques par RMN

La résolution RMN est également critique dans le cas de systèmes complexes, tels que les milieux biologiques, particulièrement dans le cadre de la métabolomique par RMN. L'analyse métabolomique [27] est employée pour identifier les signaux RMN des composés communs et ceux des composés différents dans un groupe d'échantillons très variables, pouvant contenir des centaines de composés. Une perturbation métabolique peut être détectée à l'intérieur d'un sous-groupe identifié par cette analyse statistique. Les échantillons utilisés sont très complexes : par exemple, des fluides biologiques de patients atteints de diverses pathologies, des milieux extracellulaires, ou des cellules ayant subi l'action de médicaments. La méthodologie classiquement employée réduit la complexité d'un spectre RMN unidimensionnel, découpant des zones du spectre, qui correspondent aux variables utilisées, par le procédé connu sous le nom de « *binning* ». Ce choix des variables à la base de l'analyse statistique est en relation avec la résolution apportée par l'appareillage. Lors du découpage en zones très étroites (*binning fin*), la résolution originale des spectres 1D peut être conservée. Ce découpage fin est restreint à l'étude de milieux similaires



dans lesquels une vérification et une correction minutieuse des déplacements chimiques est faite pour chaque échantillon. La superposition des signaux liée au manque de résolution en RMN pose problème, qu'elle soit due à un recouvrement intrinsèque ou à un découpage inadapté des spectres enregistrés.

La RMN métabolique des milieux complexes permet d'identifier des signaux de métabolites liés étroitement à un stade d'une maladie, telles que des formes de diabète,[28] ou de cancer,[29, 30] des maladies cardiovasculaires [31]. Cette identification est conditionnée par la possibilité de distinguer ces signaux caractéristiques de ceux des nombreuses autres molécules présentes dans ces milieux. Des approches multidimensionnelles, *i.e.*, 2D-HSQC, couplées à des spectromètres RMN de très hauts champs (> 800 MHz) peuvent être utilisées. Hormis le coût plus élevé de l'analyse, l'autre prix à payer pour des spectres multidimensionnels est l'augmentation du temps de mesure passant de quelques minutes à plusieurs heures. Il est alors préférable d'utiliser simplement le pouvoir de résolution d'un champ principal intense pour des spectres 1D.

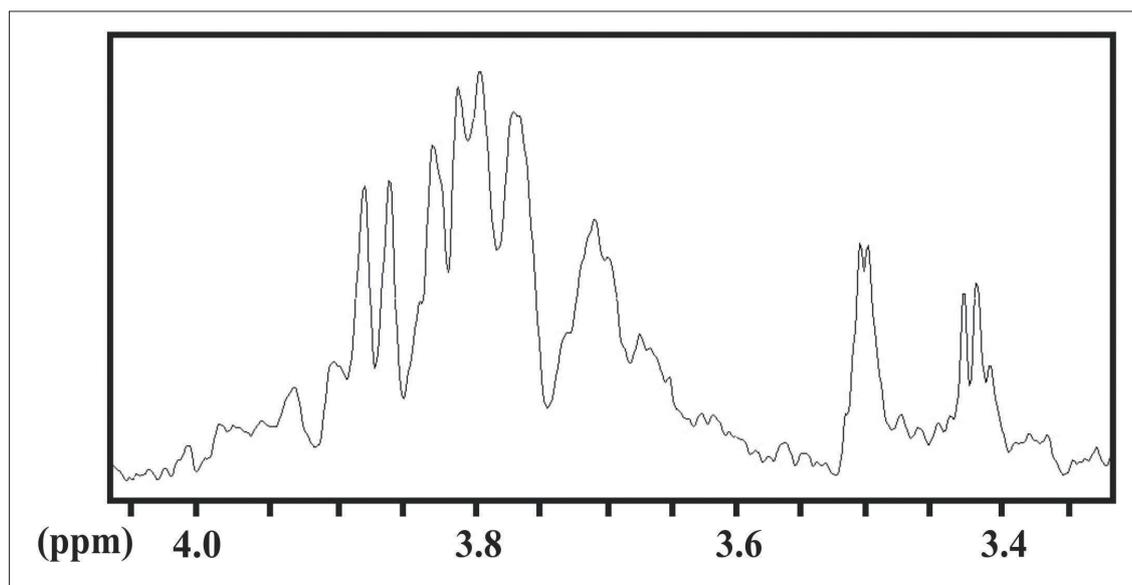
## IV - Résultats

### 1. Améliorations de la résolution RMN pour l'étude des protéines désordonnées

La fonction des protéines rigides est directement liée à leur structure tridimensionnelle. Dans

le cas de protéines intrinsèquement dépliées (*Intrinsically Disordered Proteins* ou IDPs), la fonction est liée non pas à une structure unique, mais à une distribution de structures, via leur dynamique. Les expériences de relaxation RMN fournissent des observables permettant d'étudier la dynamique des protéines. Les LLS constituent une approche complémentaire permettant d'avoir accès à des informations auxquelles les méthodes classiques de relaxation ne remontaient pas [23, 32]. La RMN est ainsi capable de fournir des informations sur la dynamique locale des protéines intrinsèquement dépliées. Nous rapportons ici des mesures de temps de relaxation de LLS sur la partie N-terminale intrinsèquement désordonnée de la protéine c-Src, constituée du domaine SH4 (14 résidus) et du domaine unique (71 résidus) [33]. Si jusqu'ici ces expériences étaient menées en RMN unidimensionnelle, il a été nécessaire, dans notre cas, de mettre au point une expérience bidimensionnelle afin de résoudre le problème de la faible dispersion spectrale, problème caractéristique pour les IDPs, issu de la similarité des environnements des différents sites nucléaires, moyennés par la dynamique.

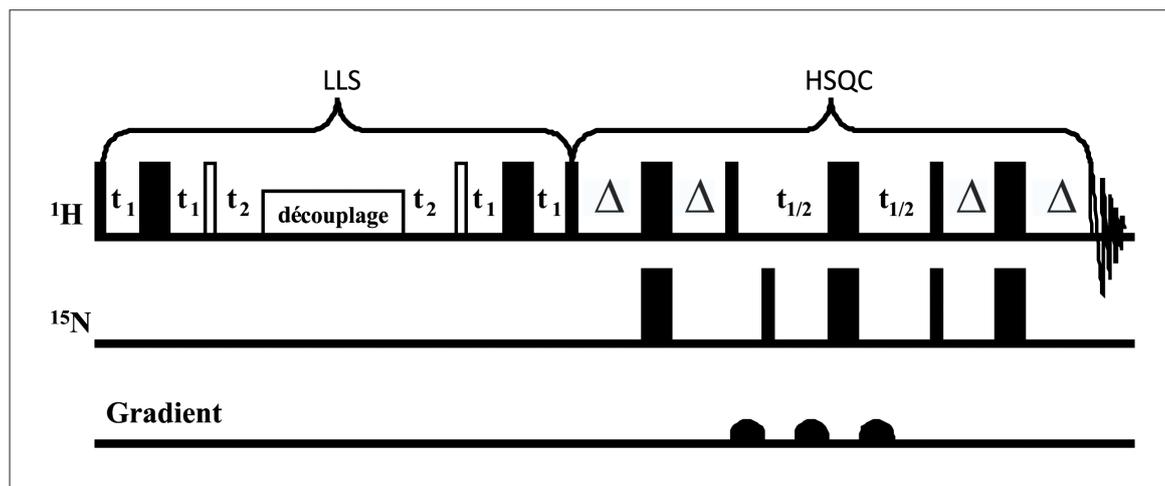
L'analyse du domaine unique de la c-Src à haut champ (500 MHz, 275 K) a permis de déterminer les temps de relaxation des LLS,  $T_{LLS} = 1,79 \pm 0,04$  s et  $T_i = 0,65 \pm 0,01$  s. La figure 2 présente le spectre LLS obtenu pour la région des signaux  $^1\text{H}$  aliphatiques correspondants aux glycines et sérines, protons pour lesquels les LLS sont facilement excités et soutenus. Le spectre LLS consiste en un massif qui ne permet pas d'isoler les résonances des différentes sérines et glycines.



**Figure 2**

Spectre 1D obtenu en excitant les états à longs temps de vie (LLS) du domaine N-terminal de la protéine c-Src. La région représentée correspond aux résonances des protons  $\alpha$  des glycines, ainsi que des protons  $\beta$  des sérines. Le domaine N-terminal de la protéine c-Src étant intrinsèquement désordonné et contenant de nombreuses sérines et glycines, les résonances individuelles dans cette région spectrale étroite ne sont pas différenciables sur un spectre 1D. On observe ainsi un massif consistant en la superposition des différentes résonances.

## Hauts champs pour la RMN des protéines désordonnées et la métabolomique de milieux complexes

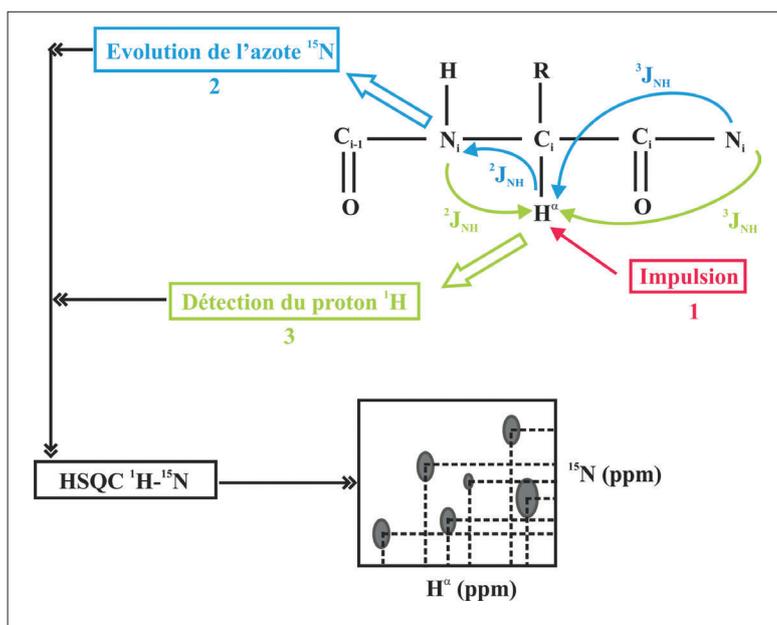


**Figure 3**

Séquence d'impulsions utilisée afin d'obtenir un spectre bidimensionnel (2D) corrélant  $H^\alpha$  à l'azote  $^{15}N$ , via un couplage scalaire de type  $^2J_{NH}$  ou  $^3J_{NH}$ . Les délais utilisés,  $\tau_1 = 17$  ms,  $\tau_2 = 9$  ms, sont les mêmes que ceux décrits par Sarkar et al. [34] pour l'optimisation de l'excitation LLS, tandis que le délai  $\Delta = 33,2$  ms a été optimisé afin d'obtenir un maximum de signal.

Un moyen de s'affranchir du problème de recouvrements des signaux sur le spectre 1D est d'enregistrer l'effet de la relaxation LLS suivie d'une évolution  $^{15}N$  en dimension indirecte pour obtenir une expérience 2D (LLS-HSQC  $^1H$ - $^{15}N$ ). La séquence HSQC « long range »  $H^\alpha/^{15}N$  est basée sur le même principe que l'expérience HSQC pour les corrélations via les couplages directs (Figure 3). Cette nouvelle version permet de mettre en corrélation le proton porté par le carbone en alpha de l'amide ( $H^\alpha$ ) et l'azote-15 ( $^{15}N$ ), via des couplages à 2 ou 3 liaisons, les couplages scalaires  $^2J_{NH}$  et  $^3J_{NH}$ . Cette expérience utilise un temps fixe d'évolution ( $\Delta$  dans la Figure 3) afin de refocaliser les couplages protons-protons pendant que se construit la cohérence en antiphase entre le proton aliphatique et le noyau  $^{15}N$  (Figure 3). La figure 4 montre la trajectoire de l'aimantation lors de cette expérience : l'impulsion initiale se fait sur le proton, la magnétisation est transférée à l'azote du même résidu (via  $^2J_{NH}$ ) ou du résidu suivant (via  $^3J_{NH}$ ) et revient sur le proton initial que l'on détecte en dernier. Dans une dimension on observe les déplacements chimiques des protons  $H^\alpha$  et dans l'autre dimension ceux des noyaux  $^{15}N$ . Dans tous les cas, sans tenir compte de la relaxation, le transfert de magnétisation dépend de  $J_{NH}$ , la valeur de la constante de couplage entre les noyaux concernés, exprimée en Hz.

Les spectres représentés dans la Figure 5 correspondent à une valeur très courte du délai de relaxation LLS,  $\tau_m \sim 0,3$  s. Le spectre 5A montre un signal faible aux alentours de la région de résonance des glycines, car la relaxation transverse diminue l'aimantation de façon dramatique lors de la construction de l'antiphase et pendant le délai de codage. Pour contourner la perte de sensibilité, cette technique peut uniquement être utilisée à très haut champ, par exemple sur un spectromètre



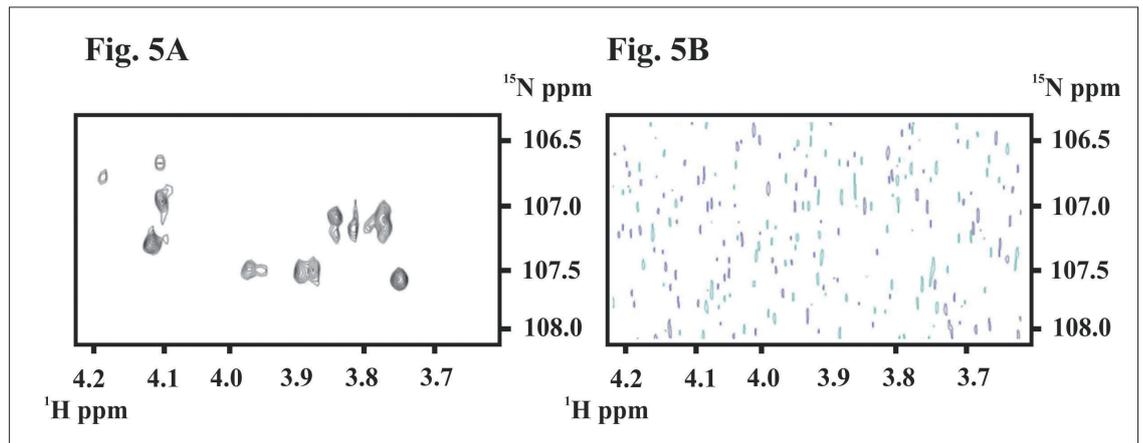
**Figure 4**

Représentation schématique du transfert d'aimantation dans la chaîne principale d'une protéine, dans le cas d'une expérience bidimensionnelle corrélant les protons  $H^\alpha$  aux  $^{15}N$  via les couplages scalaires  $^2J_{NH}/^3J_{NH}$ . Le proton  $H^\alpha$  est excité (étape 1), puis l'aimantation est transférée à l'azote du résidu précédent via un couplage  $^2J_{NH}$  ou à l'azote du même résidu via un couplage  $^3J_{NH}$ . On enregistre alors les déplacements chimiques des azotes correspondants (étape 2), avant de re-transférer l'aimantation sur le proton  $H^\alpha$  (étape 3). On obtient alors un spectre HSQC  $H^\alpha/^{15}N$ , représenté en bas de la figure.

opérant à une fréquence de 950 MHz et équipé d'une cryosonde (cf. Figure 5A). En effet, aucun signal n'est observé lorsque la même expérience LLS-HSQC est enregistrée à un champ moins élevé (500 MHz, cf. Figure 5B). Les signaux sont observés lorsque le temps de relaxation LLS,  $\tau_m$ , est augmenté. Même à haut champ, seul le signal correspondant à une valeur de  $\tau_m$  très faible a pu être observé.

**Figure 5**

Spectres  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  LLS-HSQC corrélant les protons  $^1\text{H}$  aux noyaux d'azote  $^{15}\text{N}$  enregistrés à 950 MHz avec une cryosonde (Figure 5A), et à 500 MHz (Figure 5B).



## 2. Résolution des signaux dans des expériences pour analyses métabolomique

Dans une analyse métabolomique par RMN, chaque variable est obtenue en intégrant les spectres 1D découpés en 'bins' ou 'buckets', de quelques dizaines d'Hertz, typiquement 10-20 Hz. Le résultat de cette réduction de données génère un vecteur de même dimension pour chaque spectre. La méthode statistique qui amène à la séparation de groupes différents porte le nom d'analyse en composantes principales (ACP). L'Analyse en Composantes Principales (ACP) est une méthode de projection des observations depuis l'espace des variables vers un espace de dimension réduite tel qu'un maximum d'information soit conservée. Si l'information associée aux 2 ou 3 premiers axes (composantes principales) représente un pourcentage suffisant de la variabilité totale de l'ensemble des échantillons, on pourra représenter les observations sur un graphique à 2 ou 3 dimensions, facilitant ainsi l'interprétation. Lorsque la résolution spectrale est insuffisante pour séparer les signaux, un 'bin' peut contenir plusieurs signaux de molécules différentes. Ceci pose des difficultés, et l'analyse statistique multivariée qui s'ensuit (ACP) peut échouer dans la recherche des variables discriminantes entre les populations étudiées. Idéalement,

chaque métabolite devrait être identifié par un ou plusieurs signaux isolés. Donc, la recherche des variables discriminantes dans des analyses métabolomiques et la recherche des molécules responsables de la séparation entre différents groupes peut être compromise par une résolution insuffisante. L'utilisation de champs élevés ou de séquences RMN de filtrage (sur la base des effets de diffusion translationnelle, de relaxation, etc...) en conjonction avec la RMN métabolomique peut améliorer la fiabilité d'identification des composés dans des spectres 1D.

L'effet des médicaments ou de l'expression de certaines protéines sur des cellules humaines est l'un des domaines d'application pour la métabolomique RMN. Nous avons étudié l'effet d'un composé anti-inflammatoire largement utilisé chez l'homme (*dicloféna*) sur des cellules hépatocytes HepG2, avec ou sans surexpression du cytochrome P450 CYP2C9, enzyme impliqué dans le métabolisme de ce médicament.

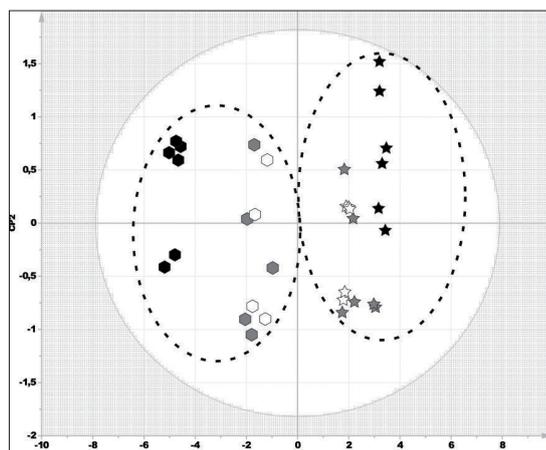
Nous avons analysé les spectres 1D  $^1\text{H}$  de milieux extracellulaires dans lesquels les cellules HepG2 ont été placées pendant 48 heures, en absence ou en présence de médicament à une concentration de 10 ou 100  $\mu\text{M}$ . À 500 MHz, des pas d'intégration ('bins', correspondant au seuil minimum de découpage des spectres) de 10 Hz (0,02 ppm), ou 20 Hz (0,04 ppm) donnent des résultats différents en ACP (Figure 6). Avec un pas de 10 Hz, l'effet de la surexpression du CYP2C9 est visible selon la composante principale 1 (CP1, axe horizontal). Selon la composante principale 2 (CP2, axe vertical), on observe, dans cette même ACP, l'effet du dicloféna à 100  $\mu\text{M}$  (Figure 6A), ce qui permet de déduire les voies métaboliques cellulaires affectées par ce médicament. Avec un pas de 20 Hz, la séparation selon l'axe CP1 se fait toujours, tandis que la séparation selon l'axe CP2 n'est plus visible (Figure 6B). Cependant, l'identification des variables incriminées dans la séparation des deux effets est impossible selon la CP1. Un pas d'intégration ('bin') de 20 Hz ne permet donc pas de séparer l'effet du médicament de celui de la surexpression de

**Figure 6**

Composantes principales correspondant aux échantillons issus du milieu extracellulaire de la lignée HEPG2 sans expression (hexagones) et avec expression du CYP2C9 (étoiles); sans dicloféna (blanc), avec dicloféna 10  $\mu\text{M}$  (gris) et 100  $\mu\text{M}$  (noir).

**A :** utilisant un découpage spectral (binning) de 20 Hz, le modèle ACP montre une séparation le long de la première composante principale, CP1, mettant en évidence aussi bien l'effet du type cellulaire que celui du traitement avec 100  $\mu\text{M}$  dicloféna.

**B :** utilisant un découpage spectral (binning) de 10 Hz, le modèle ACP montre une séparation le long de la deuxième composante principale CP2 pour le traitement à 100  $\mu\text{M}$  de dicloféna.



## Hauts champs pour la RMN des protéines désordonnées et la métabolomique de milieux complexes

CYP2C9. Un choix du pas d'intégration mimant une résolution insuffisante démontre ainsi que l'interprétation des données métabolomique via l'analyse statistique dépend de manière critique de la résolution spectrale.

### V - Conclusion

Nous illustrons ici l'avantage de l'utilisation des champs magnétiques élevés pour (i) des mesures de relaxation RMN à résolution améliorée sur un domaine protéique intrinsèquement désordonné et (ii) l'analyse par RMN métabolomique des milieux cellulaires. Pour pallier aux limitations de sensibilité et de résolution, des expériences 2D ont été mises

au point, rendant possibles des mesures de temps de relaxation LLS sur les IDPs, pour lesquelles les spectres RMN sont caractérisés par une faible dispersion des signaux. Nous introduisons ainsi une nouvelle expérience hétéronucléaire, la LLS-HSQC, qui pourra trouver des applications sur d'autres systèmes. Ces mesures requièrent un champ magnétique principal important pour être enregistrées avec une sensibilité suffisante.

La résolution spectrale est un facteur déterminant pour le succès de la métabolomique par RMN. On montre que la résolution des mesures est critique pour séparer l'effet de l'ajout d'un médicament sur des cellules de celui de la surexpression de l'enzyme impliqué dans la métabolisation de ce médicament.

### REMERCIEMENTS

**Nous remercions l'équipe RMN de Miquel Pons à l'Université de Barcelone et plus particulièrement Mariano Maffei pour l'échantillon c-Src. Christophe Guerniou et Nisrine El Hazzat ont participé à une partie des mesures et à l'analyse des résultats dans le cadre de stages de Master à l'Université Paris Descartes. Nous remercions la fédération TGIR et en particulier le site de Gif-sur-Yvette pour le temps de mesure accordé sur le spectromètre opérant à 950 MHz et équipé d'une cryosonde, ainsi que DIM Analytics et la région Ile de France (bourse de thèse à LF), la Fondation pour la Recherche Médicale (FRM ING20130526708), Paris-5 / Ville de Paris et Paris Sorbonne Cité -IdEx pour le financement.**

### BIBLIOGRAPHIE

- [1] J. CAVANAGH, W. J. FAIRBROTHER, A. G. PALMER III, N. J. SKELTON, *Protein NMR Spectroscopy: Principles and practice*, Academic Press, New York, 1996.
- [2] M. S. ALBERT, G. D. CATES, B. DRIEHUYS, W. HAPPER, B. SAAM, C. S. SPRINGER, A. WISHNIA, *Nature* 1994, 370, 199.
- [3] S. B. DUCKETT, N. J. WOOD, *Coordination Chemistry Reviews* 2008, 252, 2278.
- [4] R. KAPTEIN, in *eMagRes*, John Wiley & Sons, Ltd, 2007.
- [5] R. KAPTEIN, K. DIJKSTRA, K. NICOLAY, *Nature* 1978, 274, 293.
- [6] A. W. OVERHAUSER, *Physical Review* 1953, 92, 411.
- [7] A. W. OVERHAUSER, *Physical Review* 1953, 91, 476.
- [8] A. ABRAGAM, *Physical Review* 1955, 98, 1729.
- [9] M. GOLDMAN, *Applied Magnetic Resonance* 2008, 34, 219.
- [10] L. R. BECERRA, G. J. GERFEN, R. J. TEMKIN, D. J. SINGEL, R. G. GRIFFIN, *Physical Review Letters* 1993, 71, 3561.
- [11] J. H. ARDENKJAER-LARSEN, B. FRIDLUND, A. GRAM, G. HANSSON, L. HANSSON, M. H. LERCHE, R. SERVIN, M. THANING, K. GOLMAN, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2003, 100, 10158.
- [12] I. BERTINI, K. S. MCGREEVY, G. PARIGI, in *NMR of Biomolecules*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2012.
- [13] C. DALVIT, *Drug Discovery Today* 2009, 14, 1051.
- [14] L. E. KAY, *Journal of magnetic resonance* (San Diego, Calif. : 1997) 2011, 213, 477.
- [15] L. E. KAY, *Journal of magnetic resonance* (San Diego, Calif. : 1997) 2011, 213, 492.
- [16] G. BODENHAUSEN, D. J. RUBEN, *Chem. Phys. Lett.* 1980, 69, 185.
- [17] G. A. MORRIS, R. FREEMAN, *Journal of the American Chemical Society* 1979, 101, 760.
- [18] A. SHEKHTMAN, D. S. BURZ, *Protein NMR Techniques*, Vol. 831, Humana Press, 2012.
- [19] P. R. VASOS, J. B. HALL, R. KUEMMERLE, D. FUSHMAN, *Journal of Biomolecular Nmr* 2006, 36, 27.
- [20] M. CARRAVETTA, M. H. LEVITT, *J. Am. Chem. Soc.* 2004, 126, 6228.
- [21] M. H. LEVITT, in *Annual Review of Physical Chemistry*, Vol 63, Vol. 63 (Eds: M. A. Johnson, T. J. Martinez), 2012, pp. 89.
- [22] S. CAVADINI, P. R. VASOS, *Concepts in Magnetic Resonance Part A* 2008, 32A, 68.
- [23] A. BORNET, P. AHUJA, R. SARKAR, L. FERNANDES, S. HADJI, S. Y. LEE, A. HARIRINIA, D. FUSHMAN, G. BODENHAUSEN, P. R. VASOS, *Chemphyschem* 2011, 12, 2729.
- [24] G. PILEIO, S. BOWEN, C. LAUSTSEN, M. C. D. TAYLER, J. T. HILL-COUSINS, L. J. BROWN, R. C. D. BROWN, J. H. ARDENKJAER-LARSEN, M. H. LEVITT, *Journal of the American Chemical Society* 2013, 135, 5084.
- [25] P. AHUJA, R. SARKAR, S. JANNIN, P. R. VASOS, G. BODENHAUSEN, *Chemical Communications* 2010, 46, 8192.
- [26] R. SARKAR, P. AHUJA, P. R. VASOS, G. BODENHAUSEN, *Physical Review Letters* 2010, 104, 053001.
- [27] K. P. GARTLAND, S. M. SANINS, J. K. NICHOLSON, B. C. SWEATMAN, C. R. BEDDELL, J. C. LINDON, *NMR in biomedicine* 1990, 3, 166.
- [28] S. C. CONNOR, M. K. HANSEN, A. CORNER, R. F. SMITH, T. E. RYAN, *Molecular Biosystems* 2010, 6, 909.
- [29] L. ZHANG, H. JIN, X. GUO, Z. YANG, L. ZHAO, S. TANG, P. MO, K. WU, Y. NIE, Y. PAN, D. FAN, *Clinical Biochemistry* 2012, 45, 1064.
- [30] L. TENORI, C. OAKMAN, W. M. CLAUDINO, P. BERNINI, S. CAPPADONA, S. NEPI, L. BIGANZOLI, M. C. ARBUSHITES, C. LUCHINAT, I. BERTINI, A. DI LEO, *Molecular Oncology* 2012, 6, 437.
- [31] R. VAZQUEZ-FRESNO, R. LLORACH, F. ALCARO, M. ANGEL RODRIGUEZ, M. VINAIXA, G. CHIVA-BLANCH, R. ESTRUCH, X. CORREIG, C. ANDRES-LACUEVA, *Electrophoresis* 2012, 33, 2345.
- [32] L. FERNANDES, C. GUERNIOU, I. MARÍN-MONTESINOS, M. PONS, F. KATEB, P. R. VASOS, *Magnetic Resonance in Chemistry* 2013, 51, 729.
- [33] Y. PEREZ, M. GAIRI, M. PONS, P. BERNADO, *J. Mol. Biol.* 2009, 391, 136.
- [34] R. SARKAR, P. R. VASOS, G. BODENHAUSEN, *J. Am. Chem. Soc.* 2007, 129, 328.



# Long-lived states in an intrinsically disordered protein domain

L. Fernandes,<sup>a</sup> C. Guerniou,<sup>a</sup> I. Marín-Montesinos,<sup>b</sup> M. Pons,<sup>b</sup> F. Kateb<sup>a\*</sup> and P. R. Vasos<sup>a\*</sup>

**Long-lived states (LLS) are relaxation-favored spin population distributions of J-coupled magnetic nuclei. LLS were measured, along with classical <sup>1</sup>H and <sup>15</sup>N relaxation rate constants, in amino acids of the N-terminal Unique domain of the c-Src kinase, which is disordered *in vitro* under physiological conditions. The relaxation rates of LLS can probe motions and interactions in biomolecules. LLS of the aliphatic protons of glycines, with lifetimes approximately four times longer than their spin-lattice relaxation times, are reported for the first time in an intrinsically disordered protein domain. LLS relaxation experiments were integrated with 2D spectroscopy methods, further adapting them for studies on proteins. Copyright © 2013 John Wiley & Sons, Ltd.**

**Keywords:** NMR spectroscopy; <sup>1</sup>H spin; <sup>15</sup>N spin; relaxation; long-lived states; intrinsically disordered proteins; kinases

## Introduction

The N-terminal region of c-Src kinase (USrc), composed of an SH4 domain (14 residues) and a unique domain (71 residues), has been shown to be intrinsically disordered *in vitro*.<sup>[1]</sup> The SH4 domain is responsible for binding to the membrane, which is critical for c-Src activity,<sup>[2]</sup> whereas the unique domain is involved in the regulation of different processes, e.g. controlling mitosis through phosphorylation of different Ser and Thr residues.<sup>[3]</sup> The high sequence variability of USrc compared to corresponding domains within the family of Src kinases, corroborated with the high degree to which its sequence is conserved between species, indicate that its amino-acid composition is critical for its function.<sup>[1]</sup> None of the X-ray structures of c-Src domains solved so far contain the disordered N-terminal domain. For the investigation of unstructured protein domains that are resilient to crystallization, NMR is well positioned to obtain atomic-resolution information. The motivation of this study is to introduce new NMR experiments designed for disordered proteins and to maximize the amount of information obtained.

Relaxation of spin order involving one or several coupled nuclei can provide a sensitive probe to detect local dynamics reflecting transient secondary structure elements, as well as long-range contacts leading to locally compact conformations. Heteronuclear <sup>1</sup>H–<sup>15</sup>N relaxation experiments are a widespread and powerful approach to study molecular motions on time scales ranging from picoseconds to milliseconds.<sup>[4]</sup> Transverse <sup>15</sup>N relaxation rate constants ( $R_2$ ), longitudinal <sup>15</sup>N relaxation rates ( $R_1$ ), and heteronuclear {<sup>1</sup>H}–<sup>15</sup>N NOE in individual amino acids are sensitive to motions occurring on a time scale range from picoseconds to milliseconds. Heteronuclear relaxation experiments on intrinsically disordered proteins (IDPs) reflect the exchange between an ensemble of conformations and provide an estimate of the local autocorrelation time, which is significantly shorter than expected for a globular protein with the same number of amino acids.<sup>[5,6]</sup>

Nuclear singlet states, discovered in M. Levitt's group in Southampton,<sup>[7]</sup> are the prototype of eigenstates with slowly

equilibrated populations within an ensemble of J-coupled nuclei, which lead to the existence of long-lived states (LLS) in the Liouville space. LLS can be created, e.g. protons within an amino acid by selective excitation of diastereotopic protons or other methods,<sup>[7,8]</sup> when the chemical shifts are well resolved, or by using pulse sequences recently developed by M. Levitt and collaborators, in the case of magnetic nuclei with very close chemical shifts.<sup>[9,10]</sup> LLS can be sustained by radio-frequency irradiation or shuttling between observation and zero magnetic fields.<sup>[7,11,12]</sup> Relaxation time constants of LLS,  $T_{LLS}$ , longer than 40 times the longitudinal relaxation time constant were measured on diastereotopic Gly protons in an Ala–Gly dipeptide,<sup>[13]</sup> and  $T_{LLS}$  reaching almost half an hour have been found for the nitrogen-15 spins of nitrous oxide.<sup>[14]</sup> Aliphatic protons in systems with more than two coupled spins,<sup>[15,16]</sup> notably serines, were shown to sustain LLS in urea-unfolded proteins.<sup>[17]</sup> Gly and Ser residues are abundant in IDPs. Ser residues are often functionally important sites of posttranslational modifications, and a large number of phosphorylation processes involve serine residues in disordered regions.

Whereas <sup>15</sup>N relaxation typically reports on the local correlation time of the N–H bond vectors, LLS are less affected by dipolar interactions between spins on which they are excited, i.e., in the case of Gly residues, the interpair dipolar coupling. Therefore, LLS open the possibility to sense additional relaxation mechanisms. In the case of LLS covering only two spins, relaxation rates are completely insensitive to the intrapair dipolar relaxation. As a

\* Correspondence to: Fatiha Kateb and Paul Vasos, Equipe de RMN, Laboratoire de Chimie et Biochimie Toxicologiques et Pharmacologiques, UMR8601, Université Paris Descartes – CNRS, PRES Paris Sorbonne Cité, 45, rue des Saints-Pères, 75006 Paris, France. E-mail: fatiha.kateb@parisdescartes.fr; paul.vasos@parisdescartes.fr

a Equipe de RMN, Laboratoire de Chimie et Biochimie Toxicologiques et Pharmacologiques, UMR8601, Université Paris Descartes – CNRS, PRES Paris Sorbonne Cité, 45, rue des Saints-Pères, 75006 Paris, France

b Bio NMR Group – Faculty of Chemistry, Department of Organic Chemistry, University of Barcelona, Barcelona, Spain

consequence, LLS lifetimes are exquisitely sensitive to structural and dynamic effects arising from electronic or nuclear spins found in their external environment.<sup>[16]</sup> This makes LLS well-suited potential sensors of both intramolecular<sup>[17]</sup> or intermolecular (protein–protein and protein–ligand) interactions.<sup>[18]</sup> LLS could thus be particularly relevant in the study of protein domains that are intrinsically disordered in solution but that may fold in cells upon binding to their partners. Because their lifetimes depend on symmetry, LLS may reflect access to nonsymmetrical environments. Thus, classical relaxation measurements and LLS lifetimes provide complementary information.

We report here the first observation of LLS pertaining to nuclei within an IDP domain, and we introduce 2D experiments to detect LLS in poorly dispersed spectra typical of IDPs. USrc, the domain specifically discussed in this manuscript, has been recently shown to participate in interactions that constitute a new layer of regulation of c-Src, which is a known oncogene.<sup>[19]</sup>

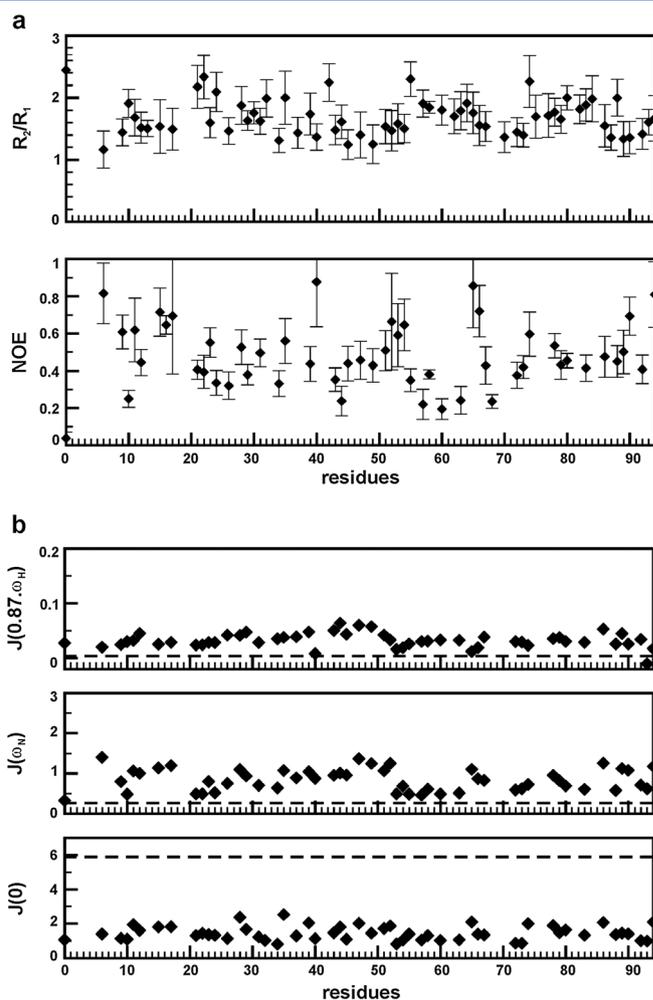
The information that enables function in rigid proteins is encoded in their 3D structure. In contrast, IDP functionality is encoded in the capacity of the unfolded chains to dynamically sample preferentially some regions of conformational space. Residual dipolar couplings<sup>[1]</sup> and relaxation measurements are physical observables that directly sense protein dynamics. LLS lifetimes provide nonredundant information with respect to the most widely used <sup>15</sup>N relaxation measurements.<sup>[5,6]</sup> Increasing the number of experimental observables helps alleviate the ambiguities arising from dynamic averaging. LLS are sustained by amino acids, such as Gly and Ser, that are very abundant in IDPs, and therefore, this study was intended as a feasibility and proof of concept project for the application of LLS to study IDPs.

## Results and Discussion

### <sup>15</sup>N relaxation

Relaxation data for 65 <sup>1</sup>H–<sup>15</sup>N pairs out of 95 residues could be measured outside spectral overlap regions (Fig. 1). In USrc, as in other IDPs,<sup>[6,20]</sup> the  $R_2/R_1$  ratio, as well as the <sup>1</sup>H–<sup>15</sup>N NOE values, are typically lower than in globular proteins of comparable molecular weight, thus reflecting its high local mobility on the relevant time scales (Fig. 1). A rigid globular protein with the molecular weight of USrc would be expected to have a correlation time  $\tau_c \sim 15$  ns at 275 K,<sup>[21]</sup> which would yield an  $R_2/R_1$  ratio of  $\sim 15$  and an NOE value of  $\sim 0.8$ . The flexibility associated with internal motions in this IDP has a sizeable effect on <sup>15</sup>N relaxation rates. The rates resemble those observed for a globular protein undergoing isotropic rotation,<sup>[22]</sup> with a  $\tau_c$  of  $\sim 3$  ns, thus confirming the high mobility of all protein segments of USrc.

Because the classical model-free approach developed by Lipari and Szabo<sup>[23,24]</sup> is not appropriate for IDPs, NMR <sup>15</sup>N relaxation measurements (<sup>15</sup>N  $R_1$  and  $R_2$  and {<sup>1</sup>H}–<sup>15</sup>N heteronuclear NOE) were analyzed using reduced spectral density mapping.<sup>[25]</sup> The results, given in Fig. 1 (bottom), show that  $J(0)$  and  $J(0.87\omega_H)$  are, respectively, lower and higher than expected in the case of the absence of internal motions. This analysis did not point out to particular motions impacting <sup>15</sup>N  $R_2/R_1$  ratios in any of the residues in a different manner than the rest, showing similar motional properties along the protein chain. A few residues showed heteronuclear NOE values larger than 0.7, suggesting some residual local order. Two of these residues are Gly65 and Gly66, located in a region previously shown to display residual dipolar coupling features sensitive to the presence of urea.<sup>[1]</sup>

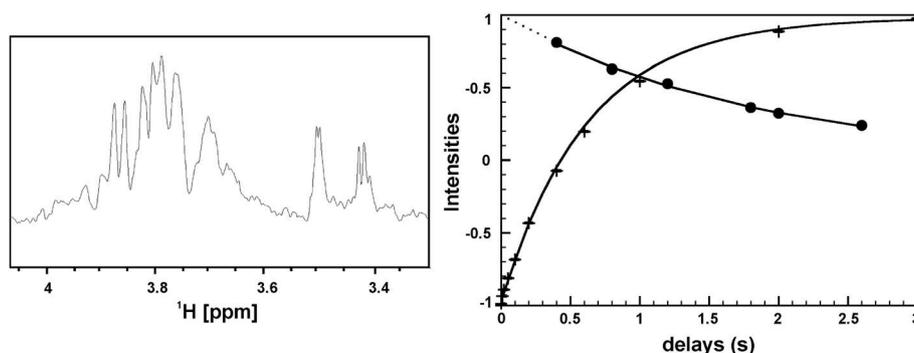


**Figure 1.** (a) <sup>15</sup>N  $R_2/R_1$  relaxation rates ratio (top) and {<sup>1</sup>H}–<sup>15</sup>N heteronuclear NOE values (bottom) recorded at 500 MHz and 275 K, plotted versus USrc residue numbers. (b) Derived spectral density mapping at the frequencies of <sup>1</sup>H,  $J(0.87\omega_H)$  (top), <sup>15</sup>N,  $J(\omega_N)$  (middle), and  $J(0)$  (bottom). Values are given in ns rad<sup>-1</sup>. The dashed lines represent expected values for a rigid, globular protein of the same molecular weight as USrc.

Paramagnetic relaxation enhancement experiments showed transient long-range interactions involving this region and other parts of the molecule.<sup>[1]</sup> The apparent rigidity of the N- and C-termini on the NOE time scale (Fig. 1) may also reflect the stabilizing effect of long-range interactions within USrc, as already observed by paramagnetic relaxation enhancement experiments.

### <sup>1</sup>H $T_1$ and $T_{LLS}$ recorded at 275 K

<sup>1</sup>H LLS have recently been shown to be a good probe for processes such as protein denaturation<sup>[17]</sup> or ligand–protein interactions.<sup>[18]</sup> 1D NMR experiments using our previous method to measure LLS lifetimes,<sup>[26]</sup> were applied on this new system (Fig. 2). Application to IDPs poses new challenges, especially because of the limited range of chemical shifts of their aliphatic protons. Because of signal overlap,  $H^\alpha$  assignment, and therefore the chemical shift difference,  $\Delta\nu(H^{\alpha 1}, H^{\alpha 2})$  could be unambiguously measured only for Gly28 and Gly66. For most of the other Gly residues, resolution was insufficient to allow stating whether the  $H^\alpha$  protons had distinct chemical shifts or were degenerate. Severe



**Figure 2.** (Left) 1D spectrum obtained following the excitation and locking of long-lived states during  $\tau_m = 2$  s in Gly residues. (Right) Intensities from inversion-recovery experiments ('+') sampled at a frequency corresponding to the region of Gly  $H^\alpha$  resonances, and LLS experimental decays corresponding to Gly  $H^\alpha$  resonances (black filled circles). Errors are within the symbol size. The corresponding fitting curves are shown as full lines.

overlap of the  $\beta$  protons of Ser residues with each other, as well as with other protons (below 3.8 ppm), prevented the determination of relaxation rates for individual Ser protons, with the exception of Ser89, which is part of the *Strep*-tag used for purification. Monoexponential recoveries of longitudinal  $^1H$  magnetization were found at 275 K, with the same relaxation rate constant throughout the spectral region corresponding to  $H^\alpha$  protons of Gly residues. There are potential added contributions to intensities observed in this region from Ser  $H^\beta$  protons, notably at 3.8 ppm. A uniform decay was also observed for the envelope exciting LLS in the same spectral range. The relaxation time constants were  $T_{LLS} = 1.79 \pm 0.04$  s and  $T_1 = 0.65 \pm 0.01$  s, i.e.  $T_{LLS}/T_1 \sim 2.7$  (Fig. 2).

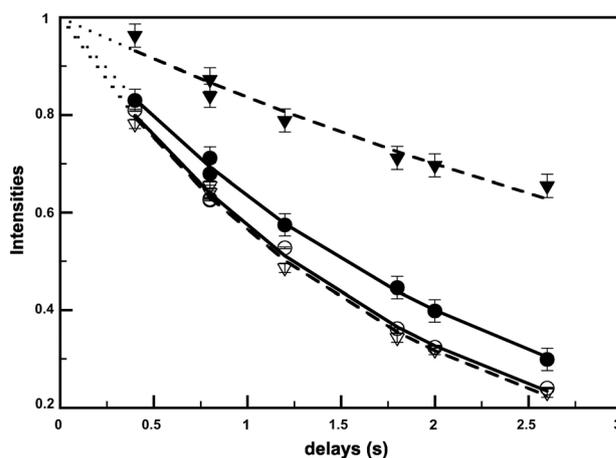
$^1H$  LLS created on Ser89, observed free from overlap at the resonances of their beta protons, show similar lifetimes to the Gly protons at 275 K,  $T_{LLS}$  (Ser) =  $1.74 \pm 0.02$  s. No LLS measurement could be made specifically for other Ser residues because of the spectral overlap. No spin states longer-lived than those of Gly could be detected in the chemical shift region including the majority of  $\beta$ -protons of Ser. These results show that the ratio between LLS relaxation and longitudinal recovery time constants at 275 K is promising in terms of sensitivity to local dynamics of the LLS. However, the LLS-derived information along the protein sequence is poorly resolved.

### $^1H$ $T_1$ and $T_{LLS}$ recorded at 293 K

In our case, raising the temperature to 293 K led to an improved ratio  $T_{LLS}/T_1 \sim 3.9$  for Gly resonances, with a longitudinal  $^1H$  relaxation time constant at this temperature  $T_1 = 0.57 \pm 0.01$  s, and LLS time constant  $T_{LLS} = 2.23 \pm 0.01$  s. Improved LLS relaxation times were expected, because LLS relaxation rates are known to decrease with decreasing local correlation times in a similar manner to  $R_2$  relaxation, whether their relaxation stems from chemical shift anisotropy differences (CSAs)<sup>[27]</sup> or from dipolar interactions with a third spin.<sup>[28,29]</sup>

Interestingly, the Ser89 LLS lifetime has a steeper temperature dependence than that of Gly residues. Raising the temperature to 293 K causes a large increase in the lifetime of LLS associated to Ser89, from  $T_{LLS}^{275K}$ (Ser) =  $1.74 \pm 0.02$  s to  $T_{LLS}^{293K}$ (Ser) =  $4.26 \pm 0.04$  s. At 293 K, the ratio  $T_{LLS}$ (Ser)/ $T_1$ (Ser)  $\sim 7.4$  is nearly twice as large compared with the one obtained at 275 K (Fig. 3).

Such differences point out that either the motional properties of Ser89 are particularly sensitive to the change in conformational propensities brought about by increasing the



**Figure 3.** LLS decays of Gly residues (circles) and Ser89 (triangles) recorded at 293 K (black filled symbols) and 275 K (black open symbols). Fitting curves are shown as full lines for Gly and dashed lines for Ser residues.

temperature, or its LLS environment is affected by other temperature-dependent factors, such as hydrogen exchange with the solvent. Exchange between hydroxyl and water in the case of Ser residues in a tetrapeptide yields a  $k_{ex}$  on the order of  $100\text{ s}^{-1}$  at this pH and around this temperature.<sup>[30]</sup> Considering that the effect of hydroxyl group exchange on the Ser LLS system to which it is coupled ( $H^\alpha$ ,  $H^{\beta 1}$ ,  $H^{\beta 2}$ ) occurs via scalar relaxation of the first and second kind,<sup>[29,31,32]</sup> one would indeed expect an increase in the relaxation time constants, when the temperature is raised to 293 K. Solvent exchange at the amide sites could, in principle, also affect LLS relaxation, but raising the temperature from 275 K to 293 K has almost no effect on Gly  $T_{LLS}$ . This could be because of (i) the slow rate constant of the amide proton exchange and (ii) the similarity of the two  $J$ -couplings between the  $H^N$  and the two  $H^\alpha$  protons.<sup>[29]</sup> Alternative explanations for the increased LLS lifetime of Ser89 spins are possible. The observation of distinct LLS lifetimes and their temperature dependence for individual residues highlight the sensitivity of these measurements to the local environment of selected residues. To exploit the potential of LLS lifetime measurements in IDPs in subsequent studies, first the spectral overlap problem has to be solved.

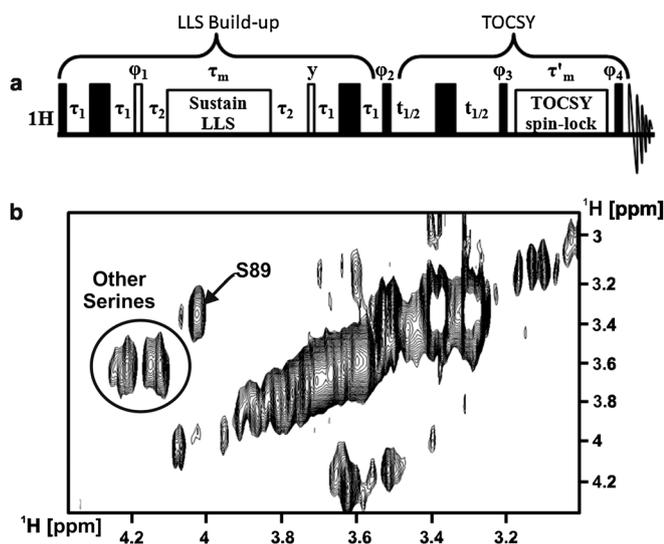
## LLS relaxation experiments detected in two dimensions

One way to address the overlap issue is to add a second dimension to LLS relaxation experiments. A 2D pulse sequence referred to as LLS–TOCSY was employed, where LLS evolution was coupled to a classical TOCSY evolution in the indirect dimension (Fig. 4a).

This sequence initially excites LLS, which, in the case of a three-proton spin system, take the form of linear combinations of population differences between singlet and triplet states on each of the spin pairs in the system.<sup>[16]</sup> Following this step, a sustaining period that gives the actual relaxation delay is introduced. The decoding retransfers LLS to single-quantum magnetization. Depending on the weight of the populations of various pairs of spins in the created LLS<sup>[16]</sup> and, more importantly, on the bias of the imperfect decoding pulse sequence, the single-quantum coherences reporting on LLS relaxation may predominantly belong to one or the other of the three protons involved. In our case, the  $H^\beta$  protons carry most of the resulting magnetization, because the shortest and most effective decoding sequence is tuned to the coupling  $^2J(H^{\beta 1}, H^{\beta 2})$ . The TOCSY transfer step and indirect evolution dimension that follow redistribute the magnetization among Ser protons. A strong signal at the  $H^\beta$  frequency in the indirect frequency dimension and at the  $H^\alpha$  frequency in the direct dimension corresponds to the magnetization decoded on  $H^\beta$  protons, as previously described, at the outcome of the LLS sequence, and transferred to  $H^\alpha$  prior to the direct detection period. The use of the sequence is to alleviate potential effects of signal overlap in the  $H^\beta$  region among various amino acids, transferring information where spectral crowding is less severe.

This transfer of magnetization from the  $H^\beta$  to the  $H^\alpha$  region can also be achieved by the use of 1D TOCSY variant with selective pulses,<sup>[33]</sup> placing the TOCSY transfer delay after the LLS pulse sequence.

In the particular case of USrc, the signals of Ser89 (Fig. 4b) could be better isolated using this TOCSY approach. Whereas



**Figure 4.** (a) Pulse sequence scheme used for the LLS–TOCSY experiment. The delays and phases used in the LLS buildup block (LLS encoding, sustain time, and decoding) are given in the Experimental section (refer to Sarkar and co-workers<sup>[26]</sup> for more details) (b) Section of the 2D LLS–TOCSY spectrum corresponding to the region of serine resonances.

on the 1D spectrum, only peaks corresponding to  $H^\beta$  chemical shifts could be observed, LLS–TOCSY allows for the identification of correlation peaks between Ser  $H^\alpha$  and  $H^\beta$  that could not be observed in the 1D experiment, thus helping in the assignment. Lack of symmetry with respect to the diagonal reflects unsymmetrical projection of LLS onto  $(H^\alpha, H^{\beta 1})$ ,  $(H^\alpha, H^{\beta 2})$  pairs on one side, and the  $(H^{\beta 1}, H^{\beta 2})$  on the other side, as expected.<sup>[16]</sup>

## Conclusion

We report the measurement of relaxation time constants of symmetry-adapted spin states with long lifetimes (LLS) in a natural IDP. LLS have the potential to probe intramolecular and intermolecular interactions in disordered protein domains. To overcome limitations stemming from resonance overlap, a 2D version of the LLS experiment is suggested, increasing the applicability of these relaxation measurements to proteins. The temperature dependence of LLS relaxation times provides a way to identify the residues displaying singular dynamics within IDPs. In light of the long lifetimes that may be observed for Ser residues and the biological relevance of Ser phosphorylation in IDPs, LLS of phosphorylated serines within USrc or other IDPs may represent a promising tool in the study of the structural and dynamic basis of regulation of eukaryotic signaling proteins through intrinsically disordered domains, provided that overlap problems can be overcome. LLS can also be used in studies of known IDPs, to test whether they become structured in cells.

## Experimental Section

The sequence of the protein domain under study is as follows:

**MASNKSKPKDASQRRRSLEPAENVHAGGGGAFPASQTPSKPASA**

*DGHRGPSAAFAPAAAEPKLFGGFNSSDVTVSPQRAGPLAGGSAWSHPQFEK*

where residues 1–14 (bold italics) belong to the SH4 domain, residues 15–85 belong to the unique domain, and the last ten residues (italics) were introduced for protein purification.

A sample in 80%  $D_2O$  and 20%  $H_2O$  was prepared by rehydrating a lyophilized 0.4 mM solution of uniformly  $^{15}N$ -labelled protein in 50 mM phosphate buffer pH = 7.0. Measurements were carried out in a Shigemi tube at 275 K. The level of deuteration was chosen to optimize the observation of amide protons while minimizing external sources of relaxation for LLS experiments.<sup>[11,26]</sup>

This sample was used for resonance assignment and  $^{15}N$  relaxation studies. A second sample in pure  $D_2O$  as a solvent but otherwise identical to the first one was used for measurements of LLS lifetimes, which are longer in deuterated solvents.

## NMR spectroscopy

All NMR spectra were recorded on a Bruker spectrometer operating at a proton frequency of 500 MHz, equipped with a 5-mm TXI  $^1H/^{13}C/^{15}N$  probe, except if mentioned otherwise, as well as on a 950-MHz spectrometer equipped with a cryoprobe.

The  $H^\alpha$ ,  $H^\beta$  chemical shifts were assigned using standard 3D and 2D TOCSY experiments acquired at 275 K in 80%  $D_2O/20\% H_2O$ . Spectra were processed using an XWinNMR/TOPSPIN package.

Proton longitudinal relaxation rates at selected frequencies of Gly- $H^\alpha$  protons at 11.74 T were measured at 275 K and 293 K using a standard inversion-recovery sequence. Eleven time points

were recorded with a recycle delay  $\delta_1 = 1$  s. A three-parameter exponential was fitted to the peak intensities using a Scilab script.

$^1\text{H}$  LLS experiments were performed at 11.74 T, as described elsewhere,<sup>[26]</sup> with  $\tau_1 = 1 / (4 \times 15) = 17$  ms and  $\tau_2 = 1 / (2 \times 55) = 9$  ms, an irradiation amplitude  $\nu_1 = 1$  kHz during the variable evolution delays  $\tau_M$ , and a relaxation recovery delay  $\delta_1 = 5$  s. Six different time points  $\tau_m$  were recorded at 275 K and 293 K.

$^{15}\text{N}$  NMR relaxation measurements, including longitudinal ( $R_1$ ) and transverse ( $R_2$ ) relaxation rates, and  $\{^1\text{H}\}-^{15}\text{N}$  heteronuclear Overhauser effect (NOE) measurements were carried out at 275 K and 11.74 T using standard methods.<sup>[34]</sup> For the  $R_1$  and  $R_2$  relaxation rates, nine and seven time points were recorded, respectively, in an interleaved manner. A two-parameter exponential decay was fitted to peak intensities using NMRViewJ.<sup>[35]</sup> In all relaxation experiments, errors were estimated from the intensities of duplicate points.

2D LLS-TOCSY experiments were recorded according to the pulse sequence scheme described in Fig. 4(a), using 2048 and 144 points in the indirect and direct dimensions, respectively. A DIPSI-2 (Decoupling In the Presence of Scalar Interactions) TOCSY sequence was used as a TOCSY spin lock, with a total duration  $\tau'_m = 60$  ms. Delays are the same as the one used in 1D experiments. The phase cycle was  $\varphi_1 = 2(y), 2(-y), \varphi_2 = x, -x, \varphi_3 = 2(x), 2(-x), \varphi_4 = 2(-x), 2(x), \varphi_{\text{rec}} = x, -x, -x, x$ . Spectra were processed using the package XWinNMR.

### Acknowledgements

The authors are very thankful to Mariano Maffei for the protein expression and purification. We thank Aude Sadet, Nisrine El Hazzat, and Gildas Bertho for their valuable assistance with these experiments. We are grateful to the TGIR-RMN-THC Fr3050 CNRS and to EPFL for NMR measurement time. This research was supported by a DIM Analytics/Ile de France contract via a PhD grant to LF. Support from Univ. Paris Descartes, the French CNRS, and the Spanish MINECO (Bio2010-15683); Generalitat de Catalunya (2009SGR13529); and EU BioNMR (contract 261863) are gratefully acknowledged.

### References

- [1] Y. Perez, M. Gairi, M. Pons, P. Bernado. *J. Mol. Biol.* **2009**, *391*, 136.
- [2] P. Patwardhan, M. D. Resh. *Mol. Cell. Biol.* **2010**, *30*, 4094.
- [3] S. J. Taylor, D. Shalloway. *Bioessays* **1996**, *18*, 9.
- [4] A. G. Palmer 3rd. *Curr. Opin. Biotechnol.* **1993**, *4*, 385.
- [5] J. F. Lefevre, K. T. Dayie, J. W. Peng, G. Wagner. *Biochemistry* **1996**, *35*, 2674.
- [6] M. Hellman, H. Tossavainen, P. Rappu, J. Heino, P. Permi. *PLoS One* **2011**, *6*, e26633.
- [7] M. Carravetta, O. G. Johannessen, M. H. Levitt. *Phys. Rev. Lett.* **2004**, *92*, 153003.
- [8] S. Cavadini, P. R. Vasos. *Concepts in Magnetic Resonance Part A* **2008**, *32A*, 68.
- [9] G. Pileio, M. Carravetta, M. H. Levitt. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2010**, *107*, 17135.
- [10] M. C. D. Tayler, M. H. Levitt. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2011**, *13*, 5556.
- [11] M. Carravetta, M. H. Levitt. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 6228.
- [12] G. Pileio, J. T. Hill-Cousins, S. Mitchell, I. Kuprov, L. J. Brown, R. C. D. Brown, M. H. Levitt. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 17494.
- [13] P. R. Vasos, A. Comment, R. Sarkar, P. Ahuja, S. Jannin, J.-P. Ansermet, J. A. Konter, P. Hautle, B. van den Brandt, G. Bodenhausen. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2009**, *106*, 18469.
- [14] G. Pileio, M. Carravetta, E. Hughes, M. H. Levitt. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 12582.
- [15] A. K. Grant, E. Vinogradov. *J. Magn. Reson.* **2008**, *193*, 177.
- [16] P. Ahuja, R. Sarkar, P. R. Vasos, G. Bodenhausen. *Chemphyschem* **2009**, *10*, 2217.
- [17] A. Bornet, P. Ahuja, R. Sarkar, L. Fernandes, S. Hadji, S. Y. Lee, A. Haririnia, D. Fushman, G. Bodenhausen, P. R. Vasos. *Chemphyschem* **2011**, *12*, 2729.
- [18] N. Salvi, R. Buratto, A. Bornet, S. Ulzega, I. R. Rebollo, A. Angelini, C. Heinis, G. Bodenhausen. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 11076.
- [19] Y. Perez, M. Maffei, A. Igea, I. Amata, M. Gairi, A. R. Nebreda, P. Bernado, M. Pons. *Sci. Rep.* **2013**, *3*, 1295.
- [20] G. Platzer, A. Schedlbauer, A. Chemelli, P. Ozdowy, N. Coudeville, R. Auer, G. Kontaxis, M. Hartl, A. J. Miles, B. A. Wallace, O. Glatter, K. Bister, R. Konrat. *Biochemistry* **2011**, *50*, 6113.
- [21] V. A. Daragan, K. H. Mayo. *Progr. NMR Spectrosc.* **1997**, *32*, 63.
- [22] N. A. Farrow, R. Muhandiram, A. U. Singer, S. M. Pascal, C. M. Kay, G. Gish, S. E. Shoelson, T. Pawson, J. D. Forman-Kay, L. E. Kay. *Biochemistry* **1994**, *33*, 5984.
- [23] G. Lipari, A. Szabo. *J. Am. Chem. Soc.* **1982**, *104*, 4546.
- [24] G. Lipari, A. Szabo. *J. Am. Chem. Soc.* **1982**, *104*, 4559.
- [25] N. A. Farrow, O. Zhang, A. Szabo, D. A. Torchia, L. E. Kay. *J. Biomol. NMR* **1995**, *6*, 153.
- [26] R. Sarkar, P. R. Vasos, G. Bodenhausen. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 328.
- [27] P. Ahuja, R. Sarkar, P. R. Vasos, G. Bodenhausen. *J. Chem. Phys.* **2007**, *127*.
- [28] M. C. D. Tayler, M. H. Levitt. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2011**, *13*, 9128.
- [29] G. Pileio. *J. Chem. Phys.* **2011**, *135*, 174502.
- [30] E. Liepinsh, G. Otting, K. Wuthrich. *J. Biomol. NMR* **1992**, *2*, 447.
- [31] F. Kateb, P. Pelupessy, G. Bodenhausen. *J. Magn. Reson.* **2007**, *184*, 108.
- [32] T. Segawa, F. Kateb, L. Duma, G. Bodenhausen, P. Pelupessy. *Chembiochem* **2008**, *9*, 537.
- [33] E. Kupce, R. Freeman. *J. Magn. Reson. Ser. A* **1993**, *105*, 310.
- [34] L. E. Kay, D. A. Torchia, A. Bax. *Biochemistry* **1989**, *28*, 8972.
- [35] B. A. Johnson, R. A. Blevins. *J. Biomol. Nmr* **1994**, *4*, 603.



# Long-Lived States and Coherences for Line Narrowing, DNP, and Study of Interactions

Simone Cavadini

Friedrich Miescher Institute for Biomedical Research, Basel, Switzerland

Laetitia Fernandes

Université Paris Descartes, Paris, France

&

Paul R. Vasos

Université Paris Descartes, Paris, France and  
Ecole Polytechnique Fédérale de Lausanne, Batochime, Lausanne, Switzerland

1	Introduction	1
2	Access to Long-lived States and Coherences	2
3	Applications	5
4	Conclusions	7
5	Related Articles	8
6	References	8

## 1 INTRODUCTION

Decay of nuclear magnetization (see **Relaxation: An Introduction**) within an ensemble of spins competes against NMR measurements, challenging their feasibility or compromising their precision.<sup>1</sup> The timescale on which experiments can follow changes in a collection of magnetic moments is limited by the memory of the impact of the first radio frequency (RF) pulse on the spin ensemble. The ordering of nuclear spins senses dynamic processes such as chemical exchange (see **Two-Dimensional Methods of Monitoring Exchange, Chemical Exchange Effects on Spectra, Chemical Exchange Effects in Biological Macromolecules**) or diffusion (see **Diffusion-Ordered Spectroscopy, Diffusion Measurements by Magnetic Field Gradient Methods**), provided that nonequilibrium spin populations can be sustained over significant time intervals compared to the time constants of these processes.

Spin memory is traditionally stored in the form of differences in populations between Zeeman eigenstates, characterized by the well-known longitudinal relaxation times,  $T_1$ . These relaxation time constants are, in the liquid state, limited by the fluctuation of local magnetic fields modulated by molecular tumbling. For spin- $\frac{1}{2}$  systems, the dominant sources of relaxation are dipole–dipole couplings and the anisotropy of chemical shifts. Consequently, a way to limit these magnetic

interactions, and thereby extend the lifetimes of populations and coherences, is to use spins with low gyromagnetic ratios, known as *heteronuclei*, such as  $^{15}\text{N}$  or  $^{13}\text{C}$ . Transfer of magnetization between sensitive protons and heteronuclei enables the use of these latter spins for preserving spin memory during extended time periods to follow slow dynamic processes. This transfer, most commonly used for gaining a second dimension to improve spectral resolution,<sup>2</sup> serves well for studies of dynamic processes that are slow on the timescale of proton relaxation but not on that of heteronuclear  $T_1$ , e.g., diffusion<sup>3</sup> and chemical exchange.<sup>4</sup> NMR of protons alone was considered charted territory starting in the 1980s, and almost every pulse sequence published began by the so-called insensitive nuclei enhanced by polarization transfer (INEPT)<sup>5,6</sup> ladder (see **INEPT**) designed to bring magnetization on heteronuclei. The convenience of heteronuclei when gains in resolution are considered, i.e., for narrowing spectral lines, is, in some cases, such that sensitivity concerns may come to a second place and protons be set aside altogether, as in *protonless spectroscopy*.<sup>7–9</sup>

A change in viewpoint became possible since the discovery of *singlet-state* spectroscopy involving homonuclear spin pairs that are rendered magnetically equivalent.<sup>10</sup> Once singlet states are populated and sustained, relaxation relents in the targeted spin group, making it a convenient NMR probe for slow processes. *Long-lived states* (LLS) in pairs of J-coupled spin- $\frac{1}{2}$  systems correspond to differences in populations between singlet and triplet states. LLS lifetimes  $T_{\text{LLS}}$  are much longer than  $T_1$  because the created spin order is immune to dipolar relaxation within the spin pair. In systems featuring several coupled spins, LLS are populations of energy levels for which the relaxation effect of dipolar interactions is less deleterious than it is for longitudinal magnetization, i.e., populations that obey  $T_{\text{LLS}} > T_1$ . Proton-only spectroscopy has significantly extended its scope with the discovery of LLS.

The favorable NMR relaxation properties of LLS stem from symmetry considerations and are reminiscent of the slow decay observed in phosphorescence. As singlet states are nonmagnetic in nature, the interconversion between systems of magnetically equivalent and inequivalent spins is key to their practical use. The development of spectroscopic tools is therefore as rich as the realm of applications, as shown by a recent survey (see **Singlet and Other States with Extended Lifetimes**) of this rapidly-growing research field.<sup>10–33</sup>

The aim of the present article is to cover especially directions that have emerged or seen dramatic developments during the last two years: the use of coherences involving singlet states, termed *long-lived coherences* (LLCs), to narrow spectroscopic lines in high magnetic fields, thereby increasing resolution, and the preservation of enhanced magnetization stemming from dissolution-dynamic nuclear polarization<sup>34</sup> (dissolution-DNP) (see **Dynamic Nuclear Polarization and High-Resolution NMR of Solids, Dynamic Nuclear Polarization: Applications to Liquid-State NMR Spectroscopy, High-Frequency Dynamic Nuclear Polarization**) in long-lived proton states. Furthermore, LLS and LLCs offer a new perspective for the study of interactions and molecular motions by NMR.

## 2 ACCESS TO LONG-LIVED STATES AND COHERENCES

### 2.1 Singlet and Triplet States

The singlet and the triplet states are eigenstates of a system of two magnetically equivalent coupled spins, e.g., a pair of magnetic nuclei, in very low magnetic field which may be described solely by their J-coupling Hamiltonian:

$$H^{\text{hf}} = J\vec{I} \cdot \vec{S} \quad (1)$$

expressed in units of the Plank constant  $h$ , where  $I$  and  $S$  are the angular momenta of the two J-coupled spins with quantum numbers  $I = S = \frac{1}{2}$ .

The eigenbasis of the Hamiltonian in equation (1) is the singlet-triplet basis, noted STB:

$$\text{STB} = \{S_0, T_{+1}, T_0, T_{-1}\} \\ = \left\{ \frac{1}{\sqrt{2}}(|\alpha_I\beta_S\rangle - |\beta_I\alpha_S\rangle), |\alpha_I\alpha_S\rangle, \right. \\ \left. \frac{1}{\sqrt{2}}(|\alpha_I\beta_S\rangle + |\beta_I\alpha_S\rangle), |\beta_I\beta_S\rangle \right\} \quad (2)$$

where  $S_0$  and  $T_{+1}$ ,  $T_0$ , and  $T_{-1}$  are the singlet and triplet states. The product basis (PB) is defined as the *ensemble of four direct products* between the Zeeman states of the two different spins  $\alpha_{I,S}$  and  $\beta_{I,S}$ .

In high magnetic fields, within a frame rotating at the average frequency of the two spins,  $\nu_{\text{av}} = (\nu_I + \nu_S)/2$ , the Hamiltonian is

$$H^{\text{hf}} = J\vec{I} \cdot \vec{S} + \frac{\Delta\nu_{IS}}{2}(I_z - S_z) \quad (3)$$

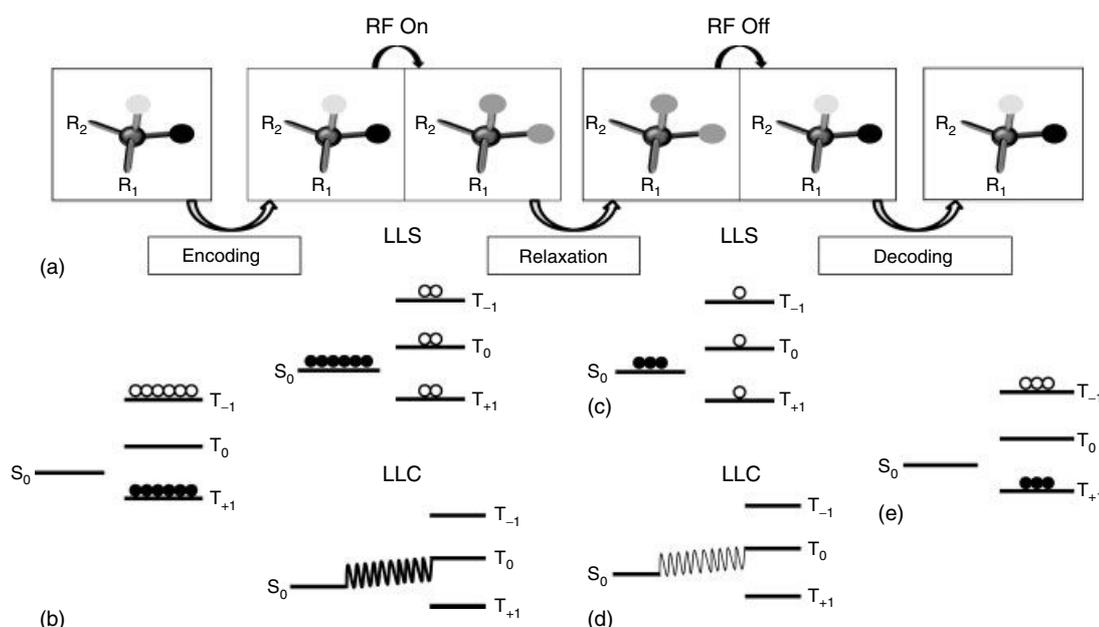
where  $\Delta\nu_{IS} = (\nu_I - \nu_S)$  is the difference between the Larmor frequencies of the two spins.

This Hamiltonian has lost symmetry with respect to a permutation between the labels of the two spins and no longer has STB as an eigenbasis.

However, there are several ways in which two coupled spin- $\frac{1}{2}$  systems can be rendered magnetically equivalent and the Hamiltonian symmetric under a permutation of the two spins: (i) shuttling the sample outside the magnetic field,<sup>10</sup> (ii) using a chemical reaction that converts a nonsymmetrical molecule into a symmetrical one,<sup>29</sup> or (iii) applying a strong RF field.<sup>11</sup> The latter option requires an oscillating RF field of high amplitude  $\nu_1$ , which may overshadow the chemical shift difference between the two spins,  $\nu_1 \gg \Delta\nu_{IS}$ . The application of the RF field corresponds to the transition from inequivalent to equivalent spins, as depicted in Figure 1(a). Provided the amplitude of the applied RF field is strong enough, or if special decoupling sequences are used, this transition may be induced in several pairs of spins in a molecule of interest or on different molecules at the same time, in a *broadband* manner.<sup>15</sup>

Given the nonmagnetic nature of the singlet state of the two spins, they should be nonequivalent at the start and at the end of the experiment (Figure 1a) in order for the experiments aiming to populate this state to be successful. Therefore, the experiment starts from equilibrium magnetization with a difference in population between the triplet states (Figure 1b) and ends in a similar situation, after loss of magnetization due to relaxation (Figure 1e). The process of interest is investigated during the time period where the two spins are rendered equivalent.

Spin populations are represented throughout Figure 1 in STB for ease of interpretation, even in the situations shown in Figure 1(b) and (e) corresponding to nonequivalent spins when these are not the eigenstates of the system. This representation



**Figure 1** (a) Interconversion between nonequivalent (light and black spheres) and equivalent (gray) J-coupled spin- $\frac{1}{2}$  pairs to access relaxation-favored states; (b) equilibrium magnetization in the singlet-triplet basis; (c) differences of populations between singlet and triplet states before and after the relaxation interval; (d) coherent superpositions between singlet and central triplet states at the beginning and at the end of an evolution interval; and (e) return to differences in populations between triplet states that may be subsequently detected (e.g., by means of a  $\pi/2$  pulse)

can also be viewed in the PB,<sup>14,22,30,32</sup> where it corresponds to differences in populations between  $|\alpha_I\alpha_S\rangle$  and  $|\beta_I\beta_S\rangle$ .

## 2.2 Spin Dynamics of Long-lived States and Long-lived Coherences

A long-lived state (LLS) in a system of two coupled spins is, in Liouville space, the difference in populations between singlet and triplet states (Figure 1c):

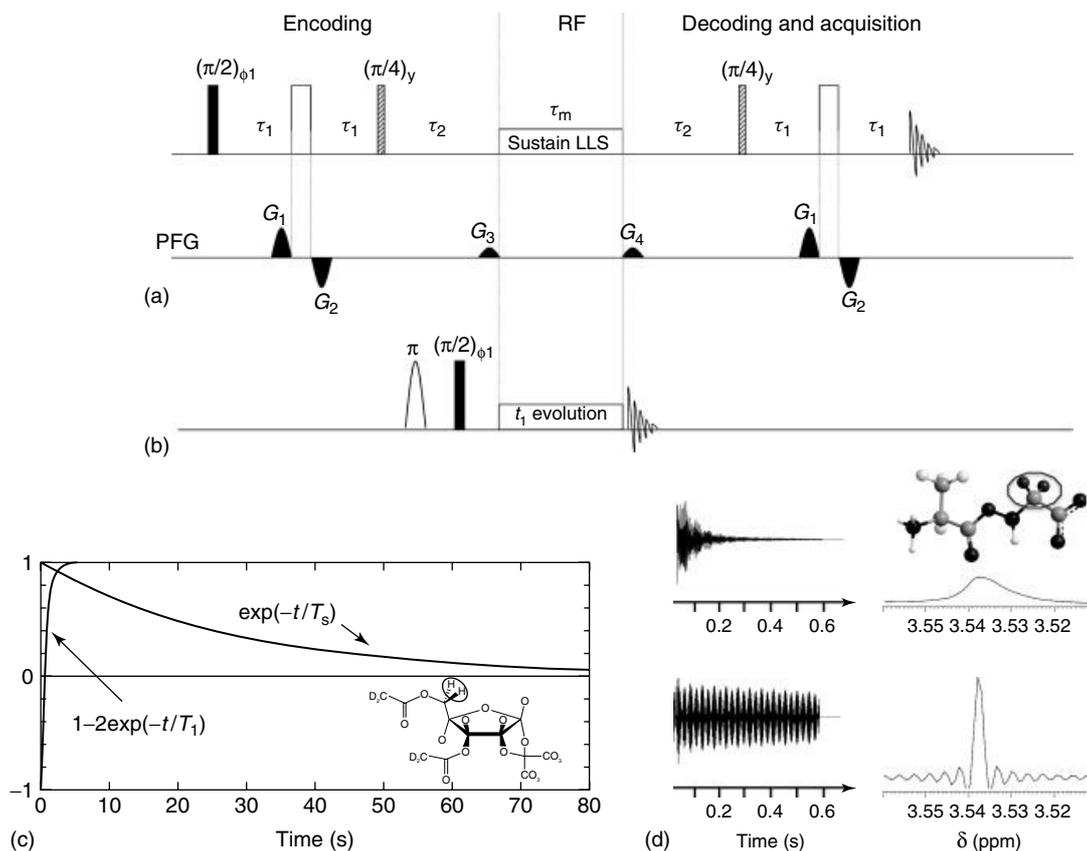
$$Q_{\text{LLS}} = |S_0\rangle\langle S_0| - \frac{1}{3}(|T_{+1}\rangle\langle T_{+1}| + |T_0\rangle\langle T_0| + |T_{-1}\rangle\langle T_{-1}|) \quad (4)$$

In terms of product operators, this state is described by

$$Q_{\text{LLS}} \equiv Q_{\text{LLS}}^{IS} = -\frac{2}{\sqrt{3}}\vec{I} \cdot \vec{S} \quad (5) \quad \frac{d}{dt}Q_{\text{LLS}} = -R_{\text{LLS}}Q_{\text{LLS}} \quad (6)$$

Once the structure of the desired operator is known, a pulse sequence (Figure 2a) can be designed to optimally excite the operator in equation (5) starting from equilibrium magnetization:  $\rho_{\text{eq}} = I_z + S_z$ . This experiment<sup>26</sup> (Figure 2a) only depends on the difference in Larmor frequencies  $\Delta\nu_{IS}$  and on the value of the J-coupling between the spins. Improvements in the bandwidth (range of chemical shifts and scalar couplings featured by the magnetic nuclei within targeted molecules) can be obtained, when necessary, using more complex pulse sequences.<sup>15,35</sup>

LLS have long relaxation time constants,  $T_{\text{LLS}} = 1/R_{\text{LLS}}$ , owing to the fact that they are not affected by dipolar interactions between the spins involved. The time evolution of LLS, shown schematically in Figure 1(c) as a decrease in the population difference between singlet and triplet states, is described by a decay during the relaxation interval  $\tau_m$  in Figure 2(a):



**Figure 2** (a) Pulse sequence driving the populations within the singlet–triplet manifold into a long-lived state (LLS), relaxation interval, and translation into observable magnetization. Pulsed-field gradients  $G_1 = G_2$  and weak gradients  $G_3$  and  $G_4$  are used for coherence selection; (b) pulse sequence for excitation of long-lived coherences (LLCs). Flip angles for the RF pulses are indicated above each pulse, and phases are shown when different from  $x$ . Phase  $\phi_1$  is cycled along with the receiver phase. The delays must be adjusted to the coupling constant  $J$ ,  $\tau_1 = 1/(4J)$ , and to the relative offset of spins  $I$  and  $S$ ,  $\tau_2 = 1/(2\Delta\nu_{IS})$ . During the evolution period  $\tau_m$ , an oscillating RF field is applied, with typical amplitudes  $\nu_1 \approx 1$ –1.5 kHz. (c) Comparison of  $T_1$  and  $T_{\text{LLS}}$  curves obtained for a monosaccharide with a five-membered furanose ring where all hydrogen atoms except positions  $H_5'$  and  $H_5''$  were substituted by deuterium atoms. For  $H_5'$  and  $H_5''$  protons, the longitudinal relaxation time constant  $T_1(H_5') = T_1(H_5'') = 0.7 \pm 0.03$  s, while  $T_{\text{LLS}}(H_5', H_5'') = 26 \pm 3$  s, i.e., longer than  $T_1$  by a factor of  $37 \pm 6$ . (d) Comparison of the FIDs and corresponding proton spectra for the  $CH_2$  protons of glycine (circled in the inset) in the dipeptide L-Ala-Gly. On the left are shown transverse coherences decaying with time constants  $T_2$  (top) and LLCs decaying with time constants  $T_{\text{LLC}}$  (bottom). Fourier transforms of the  $t_1$ -evolution shown on the right indicate that for  $T_{\text{LLC}} \gg T_2$  a net improvement in the resolution can be achieved. (Adapted with permission from R. Sarkar, P. R. Vasos, and G. Bodenhausen, *J. Am. Chem. Soc.*, 2007, **129**, 328–334. Copyright 2007 American Chemical Society and with permission from R. Sarkar, P. Ahuja, P. R. Vasos, and G. Bodenhausen, *Phys. Rev. Lett.*, 2010, **104**, 053001. Copyright (2010) by the American Physical Society)

The contributions to  $R_{\text{LLS}}$  relaxation rate constants<sup>12,28, 36–38</sup> arise from modulations of chemical shift anisotropies by the molecular tumbling, dipolar interactions with nuclear or electronic spins  $K$  outside the  $(I, S)$  pair, and spin-rotation mechanisms.

Record relaxation times  $T_{\text{LLS}}$  up to 40 times longer than  $T_1$  were measured in a partially deuterated sugar molecule (Figure 2c) as well as for the Gly aliphatic protons of the dipeptide L-Ala-Gly,<sup>26</sup> and the relaxation time constants of LLS excited on a pair of  $^{15}\text{N}$  spins reached almost 0.5 h in  $\text{N}_2\text{O}$ .<sup>20</sup>

LLS are differences in populations, so their favorable lifetimes can help transport magnetization but not detect narrower lines via Fourier transform spectroscopy. This is seen from their nonoscillatory time dependence in equation (6). Recently, transitions between singlet and triplet states were induced in low fields starting from single populations in extremely low fields.<sup>24</sup> In high-field spectroscopy, it has been shown<sup>30</sup> that *coherent superpositions* between singlet and triplet states, which can be excited starting from equilibrium magnetization, lead to significant resolution enhancement. These superpositions, shown in Figure 1(d), were named LLCs. In contrast to the populations of LLS, which decay monoexponentially, the time dependence of LLCs is oscillatory and can be followed by two-dimensional (2-D) NMR spectroscopy (see *Multidimensional Spectroscopy: Concepts*).

LLCs can be excited from equilibrium magnetization,<sup>30</sup> as shown in Figure 1(d). This visual representation corresponds to the operator

$$Q_{\text{LLC}} = |S_0\rangle\langle T_0| + |T_0\rangle\langle S_0| \quad (7)$$

This can be shown to spell,<sup>30</sup> in terms of the more familiar Cartesian product operators<sup>39</sup>

$$Q_{\text{LLC}} = I_x - S_x \quad (8)$$

It is worth noting, at this point, that product operators are given throughout this text in the quantization frame of the main field, i.e.,  $I_z$  represents magnetization parallel to  $B_0$ .

Once the desired configuration of spin order to obtain narrow lines stemming from LLCs has been identified, it remains, as in the case of LLS, to find a way to arrange spins in this configuration starting from equilibrium. This can be done by the use of a frequency-selective shaped pulse (see *Selective Pulses, Shaped Pulses*) that inverts the magnetization of one of the spins without affecting the magnetization of the other spin in the pair, as shown in Figure 2(b). The J-coupling interaction interconverts between the operators in equation (8) and a transverse form

$$Q_{\text{LLC}}^\perp = i(|T_0\rangle\langle S_0| - |S_0\rangle\langle T_0|) = 2I_yS_z - 2I_zS_x \quad (9)$$

by virtue of the coherent part of the evolution Liouvillian (see *Liouville Equation of Motion*)<sup>40</sup>:

$$\frac{d}{dt} \begin{pmatrix} Q_{\text{LLC}} \\ Q_{\text{LLC}}^\perp \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} 0 & 2i\pi J \\ -2i\pi J & 0 \end{pmatrix} \begin{pmatrix} Q_{\text{LLC}} \\ Q_{\text{LLC}}^\perp \end{pmatrix} \quad (10)$$

As shown in equation (10),  $Q_{\text{LLC}}$  oscillates with a frequency determined by the scalar coupling,  $J$ . At the same time, these coherences decay at a rate  $R_{\text{LLC}} = 1/T_{\text{LLC}}$ . LLCs are insensitive to inhomogeneous broadening since the oscillations of these coherences do not depend on the chemical shifts, i.e., the local value of the static field,  $B_0$ . This advantage comes

at a cost: the reduced spectral dispersion of LLC-derived experiments.

The contribution of the dipolar interaction between spins  $I$  and  $S$  to the intramolecular relaxation rate,  $R_{\text{LLC}}$ , may be visualized in the following subspace of the relaxation Liouvillian:

$$\frac{d}{dt} \begin{pmatrix} I_x \\ S_x \\ 2I_yS_z \\ 2I_zS_y \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} \rho_1 & \sigma_1 & 0 & 0 \\ \sigma_1 & \rho_1 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & \rho_2 & \sigma_2 \\ 0 & 0 & \sigma_2 & \rho_2 \end{pmatrix} \begin{pmatrix} I_x \\ S_x \\ 2I_yS_z \\ 2I_zS_y \end{pmatrix} \quad (11)$$

where

$$\begin{aligned} \rho_1 &= -b^2[5J_0 + 9J(\omega_0) + 6J(2\omega_0)] \\ \sigma_1 &= -b^2[4J_0 + 6J(\omega_0)] \\ \rho_2 &= -b^2[5J_0 + 3J(\omega_0) + 6J(2\omega_0)] \\ \sigma_2 &= -b^24J_0 \end{aligned} \quad (12)$$

In equation (12), the factor  $b$  measures the strength of the homonuclear dipolar coupling,  $b = -\frac{\mu_0}{80\pi} \frac{\gamma^2\hbar}{r_{IS}^3}$ ,  $r_{IS}$  is the distance between  $I$  and  $S$ ,  $J(\omega)$  are the spectral density functions,<sup>41</sup>  $J_0 = J(0) = 2\tau_c/5$ , where  $\tau_c$  is the correlation time of the spin-spin dipolar interaction. External contributions to these relaxation rates are not detailed here.

The advantage of obtaining, by experiment, a linear combination within the matrix (11) by pairing the terms with opposite signs is readily seen, as the cross-relaxation rate between  $I_x$  and  $S_x$  adds negatively to the self-relaxation of  $(I_x - S_x)$ :

$$\begin{aligned} \frac{d}{dt} \begin{pmatrix} Q_{\text{LLC}} \\ I_x + S_x \\ Q_{\text{LLC}}^\perp \\ 2I_yS_z + 2I_zS_y \end{pmatrix} &= \begin{pmatrix} R_{\text{LLC}} & 0 & 0 & 0 \\ 0 & R_2 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & R_{\text{LLC}}^\perp & 0 \\ 0 & 0 & 0 & R_{2IS} \end{pmatrix} \begin{pmatrix} Q_{\text{LLC}} \\ I_x + S_x \\ Q_{\text{LLC}}^\perp \\ 2I_yS_z + 2I_zS_y \end{pmatrix} \end{aligned} \quad (13)$$

with

$$\begin{aligned} R_{\text{LLC}} &= R_{\text{LLC}}^\perp = \rho_1 - \sigma_1 = \rho_2 - \sigma_2 \\ &= -b^2[J_0 + 3J(\omega_0) + 6J(2\omega_0)] \\ R_2 &= \rho_1 + \sigma_1 = -b^2[9J_0 + 15J(\omega_0) + 6J(2\omega_0)] \end{aligned} \quad (14)$$

This is reminiscent of the structure of relaxation-favored coherences in pairs of J-coupled heteronuclear spins used in TROSY (see *Transverse Relaxation-optimized NMR Spectroscopy with Biomacromolecular Structures in Solution*).<sup>42</sup> However, the similarities between these experiments are limited to this aspect because the *homonuclear* relaxation-favored LLCs are created by the experimenter, rather than pre-encoded by the *heteronuclear* J-coupling, as in TROSY.

In the molecular motional regime that is most detrimental to spectral lines where the “slow diffusion” approximation  $\omega\tau_c \gg 1$  applies, i.e.,  $J(\omega) \approx 0$  for all frequencies except the very low ones, it can be seen from equations (10) and (14) that

$$R_{\text{LLC}}/R_2 = 9 \quad (15)$$

Here,  $R_2$  represents the relaxation rate of transverse magnetization locked along the  $x$ -axis by the applied transverse

oscillating field of amplitude  $\nu_1$ . The lifetimes of the new coherences,  $T_{LLC} = 1/R_{LLC}$ , allows obtaining signals that are significantly sharper than was possible before their observation, as shown in Figure 2(d). A factor of up to 9 in line narrowing is contributed by the quenching of active relaxation processes, as shown by equation (15), and further improvements are obtained because  $B_0$  field inhomogeneities are innocuous to LLCs.

### 3 APPLICATIONS

Ever since the pioneering work by Carravetta and Levitt<sup>10,11</sup> showed that it is possible to excite and observe the evolution of populations of singlet states in systems containing pairs of scalar-coupled spins, a series of experiments have been proposed to make use of these promising extended timescales, with applications to studies of diffusion,<sup>26,35</sup> chemical exchange,<sup>14</sup> and quantum computing.<sup>43</sup>

A straightforward use of prolonged relaxation times is to support enhanced magnetization, generated either from para- $H_2$  (see *Parahydrogen Enhanced NMR Spectroscopic Methods: A Chemical Perspective, Sensitivity Enhancement Utilizing Parahydrogen*) itself maybe the well-known example of singlet states<sup>19,44,45</sup> or stemming from DNP.<sup>31,46</sup> This section addresses the applications of LLS for dissolution-DNP<sup>34</sup> and their potential for the study of interactions.<sup>36,37,47–50</sup>

#### 3.1 Dissolution-DNP

Among the group of methods aiming to reinforce nuclear signals using electron polarization, known collectively under the name DNP, the dissolution method<sup>34</sup> offers the highest enhancement ratios, i.e., ratios of signals measured following DNP enhancement to signals measured without prepolarization of the sample,  $\varepsilon = S_{DNP}/S$ . This factor may be, in favorable cases, i.e., for molecules to which this procedure can be conveniently applied, larger than four orders of magnitude. Furthermore, this method is well adapted for imaging and study of metabolic changes in vivo and, as such, has already been adopted by the MRI community (see *Diffusion: Clinical Utility of MRI Studies, Magnetic Resonance Imaging: A Historical Overview, Methods and Applications of Diffusion MRI*).<sup>51–53</sup> There are good prospects for translation of the method to clinical research for analysis of cancer metabolism.<sup>53,54</sup> A very large part of what makes the case of a molecule “favorable” is determined by the relaxation times of magnetization enhanced on the nuclei of the molecule in question. In the most widely used design of dissolution-DNP systems,<sup>34,55,56</sup> once polarized, a molecule subjected to this procedure leaves the polarization magnet and is shuttled to a high-field NMR or MRI magnet for analysis. For the polarization step, sample temperatures  $T = 1.2$  K and magnetic fields  $B_0 = 3.35$  T are commonly used because of the wide availability of microwave sources at the associated electron frequency, although higher values of magnetic fields were shown to improve the level of enhancement.<sup>56</sup> Following dissolution, the experiment proceeds in a high-field magnet for the time allowed by the decay of the created enhanced

polarization to (much lower) levels corresponding to thermal equilibrium at the temperature used for detection (room temperature is commonly used).

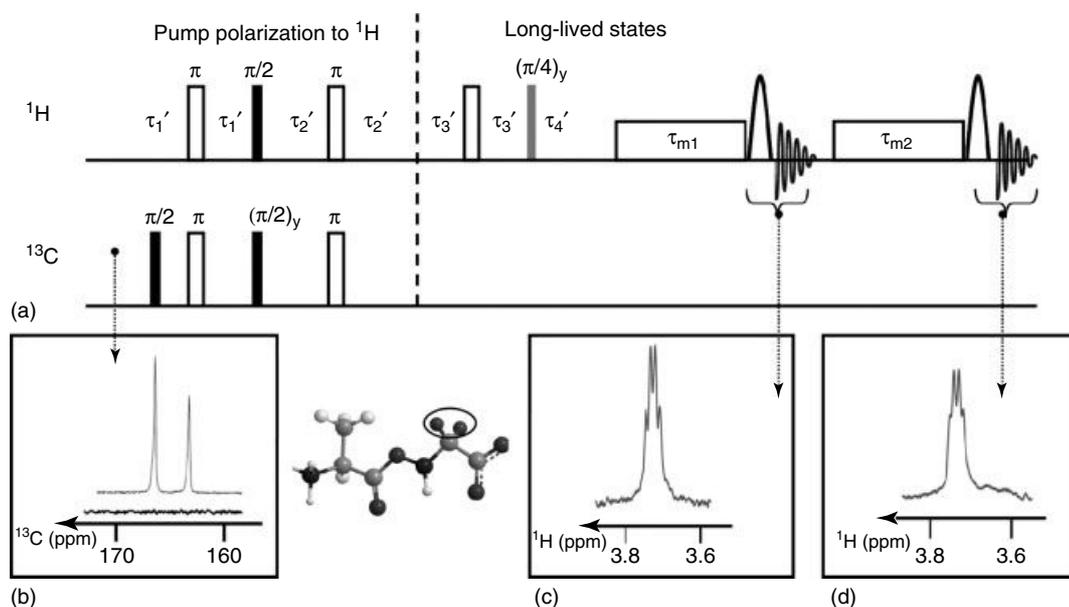
Improvements in magnetization lifetimes may benefit two of the steps in a dissolution-DNP experiment: (i) the transfer between the two magnets used for polarization and detection, which currently lasts about 5 s, except in the case of a specially conceived system with two close homogeneous centers<sup>57,58</sup> and (ii) the duration of the experiment in the high-field magnet. Conservation of the created polarization on the initial molecule, as well as on the avatars emerging via metabolic reactions, is critical for the success of the experiment.<sup>59,60</sup>

Currently, during the transfer of the sample between the two magnets, magnetization is stored on slowly relaxing “transporter spins” with low gyromagnetic ratios (such as  $^{13}C$  or  $^{15}N$ ). Because of the large enhancements, isotopes such as  $^{15}N$  or  $^{13}C$  may often be used in natural abundance. However, proton spins are often the only probes whose chemical shifts are sensitive enough to the environment to discern between various molecules on a metabolic pathway. For instance, choline, phosphocholine, and acetylcholine have the same  $^{15}N$  chemical shift but distinct  $^1H$  spectra.<sup>61</sup> Recently, it has been shown that the polarization of abundant protons rather than dilute heteronuclei with low gyromagnetic ratio (e.g.,  $^{15}N$  or  $^{13}C$ ) could be efficiently and more rapidly enhanced.<sup>62</sup> This process offers an alternative to the hyperpolarization of heteronuclei followed by magnetization transfer to protons.

For the duration of the experiment in the detection magnet, improved magnetization memory for the hyperpolarized solution is necessary to allow it to reach the areas of interest in MRI angiography<sup>51</sup> to afford metabolic imaging data for in vivo assessment of tumors,<sup>63</sup> to trace rates of cell membrane crossing and metabolic conversions for in-cell studies,<sup>60,64</sup> or to study interactions between drug candidates and biomolecules.<sup>65</sup>

A recently developed method designed to maintain polarization in LLS and extract periodically small amounts for detection<sup>46</sup> is described in Figure 3. Once hyperpolarization is created, i.e., after the enhancement of the  $^{13}C$  magnetization in a polarization magnet at low temperature, the experiment continues by rapid heating, dissolution, and transfer of the polarized sample in a high-resolution magnet. A detection step here, as shown in Figure 3(b), confirms the enhancement  $\varepsilon > 7600$  obtained for  $^{13}C$  spins. Carbon magnetization is transferred to protons using standard spectroscopic methods, and, subsequently, enhanced proton polarization is transformed into LLS that are sustained and partially converted into observable proton magnetization in successive samplings, as shown in Figure 3(c) and (d). The partial conversion allows the experimenter to preserve the remaining LLS for later observation, being able to follow the fate of the molecule of interest and its avatars during the course of the evolution.

As interactions of  $Q_{LLS}$  with outside spins are critical for the lifetimes of polarization (see discussion in the next section), quenching of the free radicals used as polarization sources before insertion of the sample in the detection magnet is crucial for the success of experiment. To this effect, ascorbate can be added to the sample when the solution is at very low temperatures ( $T = 1.2$  K).<sup>66,67</sup> Quenching of the free radicals takes place at the time of dissolution of the sample by heated water. The results of this procedure applied in conjunction with a dissolution-DNP experiment using TEMPO (2,2,6,6-tetramethylpiperidin-1-yl-oxyl) as the source



**Figure 3** Conversion of DNP-enhanced  $^{13}\text{C}$  polarization into  $^1\text{H}$  long-lived states (LLS). (a) Pulse sequence for the DNP-LLS experiment. The experiment starts with DNP-enhanced magnetization of natural abundance carbonyl  $^{13}\text{C}$  in glycine. If detection is performed at this point (b), the enhancement  $\varepsilon > 7600$  can be evidenced from the comparison of the DNP-enhanced  $^{13}\text{C}$  spectrum (top) with the room-temperature spectrum acquired without DNP (below). The hyperpolarized  $^{13}\text{C}$  magnetization is transferred to the  $\text{CH}_2$  protons of glycine in L-Ala-Gly. (c, d) The last segment of the pulse sequence is designed to transform fractions of LLS into detectable terms, sustaining the remaining part again as LLS. After encoding of LLS and sustaining during a first interval  $\tau_{m1}$ , proton magnetization can be partially converted into detectable coherences. (c) A second sustaining period  $\tau_{m1}$  and another partial conversion yield the signal at a later time point (d). The process may be repeated  $N$  times, where the integer  $N$  is limited by LLS lifetimes. The various technical procedures used for extracting magnetization from LLS at different time points are explained elsewhere.<sup>46</sup> The delays should be set to  $\tau_1' = 1/(8J_1)$ ,  $\tau_2' = 1/(4J_1)$ ,  $\tau_3' = 5/(4J_2) - \tau_2'$ , and  $\tau_4' = 1/(2\nu_{IS})$ , where, for the glycine sample,  $J_1 = J(\text{C}', \text{H}^{\alpha 1,2}) = 5.2$  Hz,  $J_2 = J(\text{H}^{\alpha 1}, \text{H}^{\alpha 2}) = 17.3$  Hz, and the chemical shift difference between the two protons is  $\Delta\nu_{IS} = 0.12$  ppm = 37.2 Hz, for  $B_0 = 7$  T. (Adapted with permission from Ref. 46 © PNAS National Academy of Sciences, 2009)

of electron polarization, to polarize a sample of L-Ala-Gly dipeptide, are shown in Figure 4(a). Elimination of the radicals is highly beneficial for the spin-lattice relaxation times  $T_1$  of transporter spins (glycine carbonyl  $^{13}\text{C}$  in Ala-Gly, in this example) and, more importantly, for the lifetimes of LLS and LLCs. This is essential for *in vivo* applications, since free radicals can be damaging and activate cellular pathways that are normally quiet. As free radicals are removed, the lines stemming from LLCs are further narrowed, as shown in Figure 4(b,c) by the comparison of decays of the LLCs involving the two protons  $\text{H}^I$  and  $\text{H}^S$  in the  $\text{C}^\alpha\text{H}_2$  group of glycine in L-Ala-Gly before and after the quenching of radicals. Indeed, the addition of 30 mM sodium ascorbate led to an increase in the lifetime of LLC by a factor of 2.7. Consequently, the measured linewidth decreased from 226 to 83 MHz.

### 3.2 Multiple Spins and Interactions

When systems consisting of more than two coupled spins are considered, two situations may arise: (i) LLS can be excited on the ensemble of spins currently, this has been demonstrated for up to five spins interconnected by J-couplings,<sup>25</sup> or (ii) LLS may only be excited on some of the spins, and the rest exert an influence on relaxation times  $T_{\text{LLS}}$  of the former, this effect depending on the geometry and the dynamics of the molecule.

As mentioned in the section "Introduction", LLS may be excited in systems comprising more than two coupled

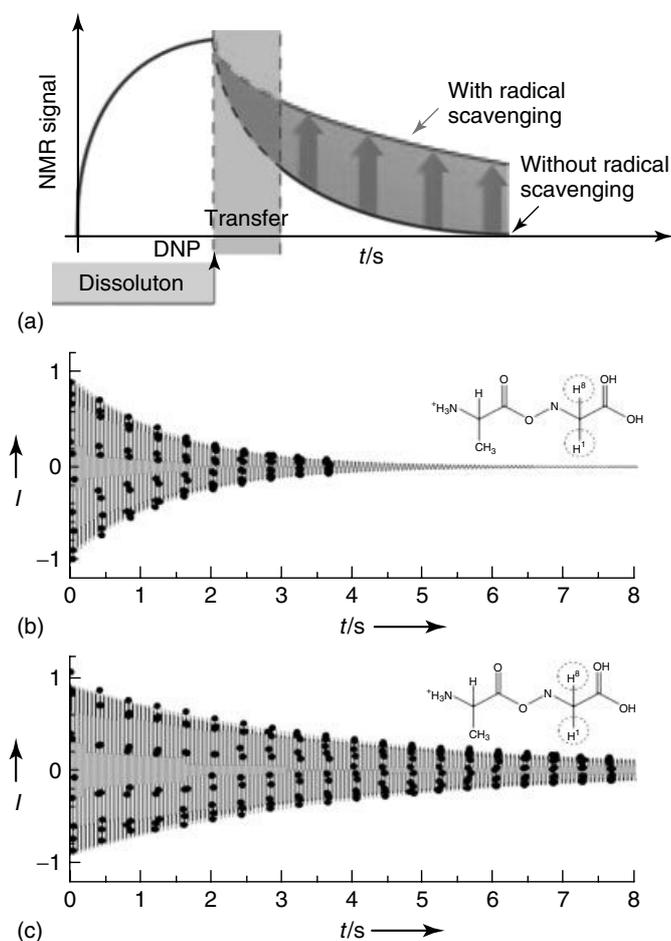
spins.<sup>13,16,18,19,25</sup> In these more complex systems, the definition of an LLS is based on its lifetime,  $T_{\text{LLS}} > T_1$ . The actual form of the eigenstates of the Hamiltonian under the same conditions as for two-spin systems can be quite complicated. For instance, in systems consisting of three spins  $I$ ,  $S$ , and  $R$ , these states take the form of linear combinations:

$$Q^{ISR} = \lambda_{IS}Q_{\text{LLS}}^{IS} + \lambda_{IR}Q_{\text{LLS}}^{IR} + \lambda_{SR}Q_{\text{LLS}}^{SR} \quad (16)$$

where the coefficients  $\lambda$  depend of the J-couplings interconnecting the three spins.<sup>25,45</sup> As for LLS, it may be possible to excite and sustain LLCs in groups involving more than two coupled spins. This is important to limit transverse relaxation within extended spin ensembles, to measure more precisely J-coupling constants in high-field NMR, or to resolve signals.

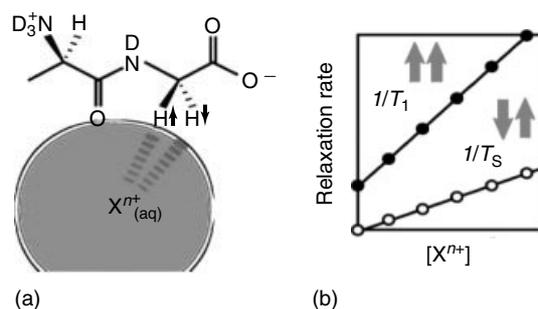
Given the dependence of their relaxation time constants on the distance to outside spins and correlation times of molecular motions,<sup>30,36</sup> LLS and LLCs are convenient new probes for interactions and molecular motions. The behavior of LLS in the presence of interactions with an external nuclear or electronic spin  $K$  has been investigated both for intramolecular<sup>36,49,50</sup> and intermolecular interactions<sup>37</sup> and experiments targeted interactions with external nuclear as well as electron spins.<sup>36,49</sup> Similar to the relaxation times of heteronuclei in a proton-free environment,<sup>68</sup> the extended lifetimes are sensitive probes to the environment or to interactions that may be overshadowed by the strong close-range dipolar interactions.

Figure 5 shows the results obtained by Tayler and Levitt<sup>49</sup> demonstrating that LLS lifetimes are affected to a lesser



**Figure 4** (a) Schematic representation of the DNP-LLS experiments with or without radical scavenging. Scavengers such as sodium ascorbate can reduce the nuclear polarization losses during the dissolution process. During the transfer, magnetization is preserved on  $^{13}\text{C}$  spins, whose longitudinal relaxation time  $T_1$  is prolonged by the quenching of TEMPO, affording a gain of almost a factor 2 in sensitivity at the beginning of the experiment compared to the situation where sodium ascorbate is not mixed to the solution. Furthermore, lifetimes of LLS encoded on aliphatic protons during the experiment are prolonged by a factor of 7 by the quenching of TEMPO. (b) The decay of the long-lived coherence (LLC) involving the two aliphatic protons  $\text{H}^I$  and  $\text{H}^S$  of glycine in L-Ala-Gly is affected by the presence of 2.5 mM TEMPO ( $T_{\text{LLC}} = 1.43$  s). (c) After addition of 30 mM sodium ascorbate, the lifetime ( $T_{\text{LLC}} = 3.82$  s) is extended by a factor of 2.7. Both signals were measured at  $T = 296$  K and  $B_0 = 7.05$  T without DNP and fitted with monoexponential decays multiplied by a sine functions. The modulation arises from the scalar coupling constant  $J = 17.242$  Hz. The LLCs were sustained by continuous wave (CW) irradiation. (Reproduced with permission from Ref. 66 © Wiley-VCH, 2010)

degree by the presence of external electron spins compared to the spin-lattice relaxation times  $T_1$ . This study measured the effect of the concentration of metal ions such as  $\text{Cu}^{2+}(\text{aq})$ ,  $\text{Mn}^{2+}(\text{aq})$ , and  $\text{Gd}^{3+}(\text{aq})$  on the relaxation rates of longitudinal magnetization and LLS (Figure 5b). It turned out that singlet states are between 2 and 3 times less sensitive to paramagnetic relaxation than longitudinal nuclear magnetization. Interactions with paramagnetic centers have been extensively used to obtain structural information for biomolecules (see *Paramagnetic Relaxation in Solution*,



**Figure 5** (a) Schematic representation of the interaction between paramagnetic ions  $\text{X}^{n+}$  and pairs of protons locked in a singlet configuration. (b) Relaxation rates of longitudinal magnetization ( $1/T_1$ ) and populations of singlet states ( $1/T_S$ ) as the concentration of free radicals in the vicinity of a pair of protons increases. Taylor and Levitt<sup>49</sup> measured the relaxation effect of metal ions  $\text{X}^{n+}(\text{aq}) = \text{Cu}^{2+}(\text{aq})$ ,  $\text{Mn}^{2+}(\text{aq})$ , and  $\text{Gd}^{3+}(\text{aq})$ . (M. C. D. Taylor and M. H. Levitt, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2011, 13, 9128-9130. Reproduced by permission of the PCCP Owner Societies)

*Paramagnetic Systems in Biochemistry: Solution NMR Studies*). LLS in combination with paramagnetic tags have the potential to detect long-range intra and intermolecular interactions.

LLS can be used to obtain information on the compactness and dynamics of a molecule.<sup>69</sup> It has been shown that the lifetimes of LLS are superior in mobile loops and surface areas compared to the protein core. LLS are, therefore, a convenient reporter of protein folding, via an increase in lifetimes as proteins unfold due to the reduction of local spin density and to the increased mobility in various protein segments. Using LLS, a structural change could be detected in the  $\beta$ -sheet of ubiquitin early in the unfolding process.<sup>69</sup> The stability of two ubiquitin mutants could be compared, from the point of view of structural and motional changes sensed by LLS, to that of native ubiquitin under denaturing conditions induced by the presence of urea and changes in the pH.

#### 4 CONCLUSIONS

The discovery of relaxation-favored spin configurations relying on the population of singlet states is of consequence especially within groups of protons, the most abundant and sensitive magnetic nuclei, whose main shortcoming was their short-term spin memory. LLS extend the limit of sensitivity-enhancement applications in liquid-state NMR and increase the timescale on which chemical exchange and diffusion processes can be followed by NMR. Sustaining spin memory promises to provide DNP-enhanced MRI with the potential to follow metabolic processes on longer time scales. LLS and LLCs were successfully used to investigate peptides, nucleotides, and small proteins. Extension of dissolution-DNP coupled with LLS to large proteins is possible, provided the critical issue of relaxation during the transfer between polarization and detection magnets is solved. Relaxation rate constants  $R_{\text{LLS}}$  and  $R_{\text{LLC}}$  offer a new window for NMR on interactions and dynamic processes. The enhancement in resolution afforded by LLCs opens the way to the study of macromolecules that have rotational correlation times in

solution an order of magnitude longer than the current limits, provided these methods are aided by selective deuteration. There are numerous perspectives for these experiments in the field of biochemical studies as well as for translation to biomedical applications.

## 5 RELATED ARTICLES

Chemical Exchange Effects in Biological Macromolecules; Chemical Exchange Effects on Spectra; Diffusion-Ordered Spectroscopy; Diffusion: Clinical Utility of MRI Studies; Diffusion Measurements by Magnetic Field Gradient Methods; Dynamic Nuclear Polarization: Applications to Liquid-State NMR Spectroscopy; Dynamic Nuclear Polarization and High-Resolution NMR of Solids; Field Gradients and Their Application; High-Frequency Dynamic Nuclear Polarization; INEPT; Liouville Equation of Motion; Magnetic Resonance Imaging: A Historical Overview; Methods and Applications of Diffusion MRI; Multidimensional Spectroscopy: Concepts; Parahydrogen Enhanced NMR Spectroscopic Methods: A Chemical Perspective; Paramagnetic Relaxation in Solution; Paramagnetic Systems in Biochemistry: Solution NMR Studies; Relaxation: An Introduction; Selective Pulses; Sensitivity Enhancement Utilizing Parahydrogen; Shaped Pulses; Singlet and Other States with Extended Lifetimes; Transverse Relaxation-optimized NMR Spectroscopy with Biomacromolecular Structures in Solution; Two-Dimensional Methods of Monitoring Exchange.

## 6 REFERENCES

1. R. R. Ernst, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 1992, **31**, 805–823.
2. G. Bodenhausen and D. J. Ruben, *Chem. Phys. Lett.*, 1980, **69**, 185–189.
3. F. Ferrage, M. Zoonens, D. E. Warschawski, J. L. Popot, and G. Bodenhausen, *J. Am. Chem. Soc.*, 2003, **125**, 2541–2545.
4. P. Wenter, G. Bodenhausen, J. Dittmer, and S. Pitsch, *J. Am. Chem. Soc.*, 2006, **128**, 7579–7587.
5. G. A. Morris and R. Freeman, *J. Am. Chem. Soc.*, 1979, **101**, 760–762.
6. D. P. Burum and R. R. Ernst, *J. Magn. Reson.*, 1980, **39**, 163–168.
7. W. Bermel, I. Bertini, L. Duma, I. C. Felli, L. Emsley, R. Pierattelli, and P. R. Vasos, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2005, **44**, 3089–3092.
8. I. Bertini, L. Duma, I. C. Felli, M. Fey, C. Luchinat, R. Pierattelli, and P. R. Vasos, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2004, **43**, 2257–2259.
9. C. Caillet-Saguy, M. Delepierre, A. Lecroisey, I. Bertini, M. Piccioli, and P. Turano, *J. Am. Chem. Soc.*, 2006, **128**, 150–158.
10. M. Carravetta, O. G. Johannessen, and M. H. Levitt, *Phys. Rev. Lett.*, 2004, **92**, 153003.
11. M. Carravetta and M. H. Levitt, *J. Am. Chem. Soc.*, 2004, **126**, 6228–6229.
12. M. Carravetta and M. H. Levitt, *J. Chem. Phys.*, 2005, **122**, 214505.
13. G. Pileio, M. Concistré, M. Carravetta, and M. H. Levitt, *J. Magn. Reson.*, 2006, **182**, 353–357.
14. R. Sarkar, P. R. Vasos, and G. Bodenhausen, *J. Am. Chem. Soc.*, 2007, **129**, 328–334.
15. R. Sarkar, P. Ahuja, D. Moskau, P. R. Vasos, and G. Bodenhausen, *ChemPhysChem*, 2007, **8**, 2652–2656.
16. G. Pileio and M. H. Levitt, *J. Magn. Reson.*, 2007, **187**, 141–145.
17. E. Vinogradov and A. K. Grant, *J. Magn. Reson.*, 2007, **188**, 176–182.
18. A. K. Grant and E. Vinogradov, *J. Magn. Reson.*, 2008, **193**, 177–190.
19. E. Vinogradov and A. K. Grant, *J. Magn. Reson.*, 2008, **194**, 46–57.
20. G. Pileio, M. Carravetta, E. Hughes, and M. H. Levitt, *J. Am. Chem. Soc.*, 2008, **130**, 12582–12583.
21. G. Pileio and M. H. Levitt, *J. Magn. Reson.*, 2008, **191**, 148–155.
22. S. Cavadini and P. R. Vasos, *Concepts Magn. Reson.*, 2008, **32A**, 68–78.
23. G. Pileio, S. Mamone, G. Mollica, I. M. Montesinos, A. Gansmuller, M. Carravetta, S. P. Brown, and M. H. Levitt, *Chem. Phys. Lett.*, 2008, **456**, 116–121.
24. G. Pileio, M. Carravetta, and M. H. Levitt, *Phys. Rev. Lett.*, 2009, **103**, 083002.
25. P. Ahuja, R. Sarkar, P. R. Vasos, and G. Bodenhausen, *ChemPhysChem*, 2009, **10**, 2217–2220.
26. P. Ahuja, R. Sarkar, P. R. Vasos, and G. Bodenhausen, *J. Am. Chem. Soc.*, 2009, **131**, 7498–7499.
27. A. A. Karabanov, C. Bretschneider, and W. Kockenberger, *J. Chem. Phys.* 2009, **131**, 204105.
28. G. Pileio and M. H. Levitt, *J. Chem. Phys.* 2009, **130**, 214501.
29. W. S. Warren, E. Jenista, R. T. Branca, and X. Chen, *Science*, 2009, **323**, 1711–1714.
30. R. Sarkar, P. Ahuja, P. R. Vasos, and G. Bodenhausen, *Phys. Rev. Lett.*, 2010, **104**, 053001.
31. G. Pileio, M. Carravetta, and M. H. Levitt, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 2010, **107**, 17135–17139.
32. R. Sarkar, P. Ahuja, P. R. Vasos, A. Bornet, O. Wagnieres, and G. Bodenhausen, *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.*, 2011, **59**, 83–90.
33. M. C. D. Tayler and M. H. Levitt, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2011, **13**, 5556–5560.
34. J. H. Ardenkjaer-Larsen, B. Fridlund, A. Gram, G. Hansson, L. Hansson, M. H. Lerche, R. Servin, M. Thaning, and K. Golman, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 2003, **100**, 10158–10163.
35. R. Sarkar, P. Ahuja, P. R. Vasos, and G. Bodenhausen, *ChemPhysChem*, 2008, **9**, 2414–2419.
36. P. Ahuja, R. Sarkar, P. R. Vasos, and G. Bodenhausen, *J. Chem. Phys.*, 2007, **127**, 134112.
37. G. Pileio, *J. Chem. Phys.*, 2011, **134**, 214505.
38. G. Pileio, *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.*, 2010, **56**, 217–231.
39. O. W. Sorensen, G. W. Eich, M. H. Levitt, G. Bodenhausen, and R. R. Ernst, *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.*, 1983, **16**, 163–192.
40. J. Cavanagh, W. J. Fairbrother, A. G. Palmer, M. Rance, and N. J. Skelton, 'Protein NMR Spectroscopy: Principles and Practice', 2nd edn., Academic Press Inc.: San Diego, 2006.
41. R. R. Ernst, G. Bodenhausen, and A. Wokaun, 'Principles of Nuclear Magnetic Resonance in One and Two Dimensions', Oxford University Press: Oxford, 1987, Vol. 1987.
42. K. Pervushin, R. Riek, G. Wider, and K. Wuthrich, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1997, **94**, 12366–12371.
43. S. S. Roy and T. S. Mahesh, *Phys. Rev. A*, 2010, **82**, 52302–52307.
44. T. Jonischkeit, U. Bommerich, J. Stadler, K. Woelk, H. G. Niessen, and J. Bargon, *J. Chem. Phys.*, 2006, **124**, 201109.
45. D. Canet, S. Bouguet-Bonnet, C. Aroulanda, and F. Reineri, *J. Am. Chem. Soc.*, 2007, **129**, 1445–1449.
46. P. R. Vasos, A. Comment, R. Sarkar, P. Ahuja, S. Jannin, J.-P. Ansermet, J. A. Konter, P. Hautle, B. van den Brandt,

- and G. Bodenhausen, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 2009, **106**, 18469–18473.
47. E. Sartori, M. Ruzzi, N. J. Turro, K. Komatsu, Y. Murata, R. G. Lawler, and A. L. Buchachenkol, *J. Am. Chem. Soc.*, 2008, **130**, 2221–2225.
48. N. J. Turro, J. Y. C. Chen, E. Sartori, M. Ruzzi, A. Marti, R. Lawler, S. Jockusch, J. Lopez-Gejo, K. Komatsu, and Y. Murata, *Acc. Chem. Res.*, 2010, **43**, 335–345.
49. M. C. D. Tayler and M. H. Levitt, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2011, **13**, 9128–9130.
50. M. C. D. Tayler, S. Marie, A. Ganesan, and M. H. Levitt, *J. Am. Chem. Soc.*, 2010, **132**, 8225.
51. K. Golman, J. H. Ardenkjaer-Larsen, J. S. Petersson, S. Mansson, and I. Leunbach, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 2003, **100**, 10435–10439.
52. K. Golman, R. in't Zandt, and M. Thaning, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 2006, **103**, 11270–11275.
53. J. Kurhanewicz, D. B. Vigneron, K. Brindle, E. Y. Chekmenev, A. Comment, C. H. Cunningham, R. J. DeBerardinis, G. G. Green, M. O. Leach, S. S. Rajan, R. R. Rizi, B. D. Ross, W. S. Warren, and C. R. Malloy, *Neoplasia*, 2011, **13**, 81–97.
54. S. E. Day, M. I. Kettunen, F. A. Gallagher, D. E. Hu, M. Lerche, J. Wolber, K. Golman, J. H. Ardenkjaer-Larsen, and K. M. Brindle, *Nat. Med. (NY, U. S.)*, 2007, **13**, 1521–1521.
55. A. Comment, B. van den Brandt, K. Uffmann, F. Kurdzesau, S. Jannin, J. A. Konter, P. Hautle, W. T. H. Wenckebach, R. Gruetter, and J. J. van der Klink, *Concepts Magn. Reson. Part B - Magn. Reson. Eng.*, 2007, **31B**, 255–269.
56. S. Jannin, A. Comment, F. Kurdzesau, J. A. Konter, P. Hautle, B. van den Brandt, and J. J. van der Klink, *J. Chem. Phys.*, 2008, **128**, 241102.
57. J. Leggett, R. Hunter, J. Granwehr, R. Panek, A. J. Perez-Linde, A. J. Horsewill, J. McMaster, G. Smith, and W. Kockenberger, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2010, **12**, 5883–5892.
58. J. Granwehr, R. Panek, J. Leggett, and W. Kockenberger, *J. Chem. Phys.* 2010, **132**, 244507
59. K. Golman, R. I. Zandt, M. Lerche, R. Pehrson, and J. H. Ardenkjaer-Larsen, *Cancer Res.*, 2006, **66**, 10855–10860.
60. T. Harris, G. Eliyahu, L. Frydman, and H. Degani, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 2009, **106**, 18131–18136.
61. R. Sarkar, A. Comment, P. R. Vasos, S. Jannin, R. Gruetter, G. Bodenhausen, H. Hall, D. Kirik, and V. P. Denisov, *J. Am. Chem. Soc.*, 2009, **131**, 16014–16015.
62. P. Ahuja, R. Sarkar, S. Jannin, P. R. Vasos, and G. Bodenhausen, *Chem. Commun. (Camb. U. K.)*, 2010, **46**, 8192–8194.
63. S. J. Nelson, D. Vigneron, J. Kurhanewicz, A. Chen, R. Bok, and R. Hurd, *Appl. Magn. Reson.*, 2008, **34**, 533–544.
64. F. A. Gallagher, M. I. Kettunen, S. E. Day, M. Lerche, and K. M. Brindle, *Magn. Reson. Med.*, 2008, **60**, 253–257.
65. M. H. Lerche, S. Meier, P. R. Jensen, H. Baumann, B. O. Petersen, M. Karlsson, J. O. Duss, and J. H. Ardenkjaer-Larsen, *J. Magn. Reson.*, 2010, **203**, 52–56.
66. P. Mieville, P. Ahuja, P. Sarkar, S. Jannin, P. R. Vasos, S. Gerber-Lemaire, M. Mishkovsky, A. Comment, R. Gruetter, O. Ouari, P. Tordo, and G. Bodenhausen, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 2010, **49**, 6182–6185.
67. P. Mieville, P. Ahuja, R. Sarkar, S. Jannin, P. R. Vasos, S. Gerber-Lemaire, M. Mishkovsky, A. Comment, R. Gruetter, O. Ouari, P. Tordo, and G. Bodenhausen, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2010, **49**, 7834–7834.
68. P. R. Vasos, J. B. Hall, R. Kummerle, and D. Fushman, *J. Biomol. NMR*, 2006, **36**, 27–36.
69. A. Bornet, P. Ahuja, R. Sarkar, L. Fernandes, S. Hadji, S. Y. Lee, A. Haririnia, D. Fushman, G. Bodenhausen, and P. R. Vasos, *ChemPhysChem*, 2011, doi: 10.1002/cphc.201100365.

### Acknowledgments

We would like to thank Geoffrey Bodenhausen for numerous discussions and Malcolm Levitt for comments on the text. Dissolution-DNP experiments were performed on a system designed by Arnaud Comment and Jacques van der Klink at the Ecole Polytechnique Fédérale de Lausanne (EPFL). In chronological order, we acknowledge Riddhiman Sarkar, Puneet Ahuja, Arnaud Comment, Sami Jannin, Aurélien Bornet, Pascal Miéville, Sonia Hadji, and Gildas Bertho for help with a number of experiments described herein. Martial Rey provided valuable technical assistance. This work was supported by the Swiss National Science Foundation (*Ambizione* grant PZ00P2.121928 to P.V.), the EPFL, the Paris Descartes University and the French CNRS.

### Biographical Sketches

Simone Cavadini, *b.* 1979, Dipl. Chem. 2005, Ecole Polytechnique Fédérale de Lausanne (EPFL), Switzerland. Ph.D. Physical Chemistry 2009, EPFL, Switzerland. Currently Postdoctoral Fellow (group Nicolas Thomä) at Friedrich Miescher Institute for Biomedical Research, Basel, Switzerland. Research interests: structural and biochemical studies of protein complexes associated with DNA repair and maintenance.

Laetitia Fernandes, *b.* 1987, MSc student (Master 1) Paris Descartes University, 2011, Chemistry for Life Sciences. Research: NMR Spectroscopy.

Paul R. Vasos, *b.* 1977, PhD, Structural Biology, 2004, CERM—the Magnetic Resonance Centre at the University of Florence. Postdoctoral research at the University of Maryland and at the Ecole Polytechnique de Lausanne (EPFL). Currently: Professor, Paris Descartes University. Research interests: NMR methods: line narrowing and sensitivity enhancement, in-cell NMR spectroscopy, protein folding.



# Long-Lived States to Monitor Protein Unfolding by Proton NMR

Aurélien Bornet,<sup>[c]</sup> Puneet Ahuja,<sup>[c]</sup> Riddhiman Sarkar,<sup>[b]</sup> Laetitia Fernandes,<sup>[a]</sup> Sonia Hadji,<sup>[a]</sup> Shirley Y. Lee,<sup>[d]</sup> Aydin Haririnia,<sup>[d]</sup> David Fushman,<sup>[d]</sup> Geoffrey Bodenhausen,<sup>[c, e, f, g]</sup> and Paul R. Vasos<sup>\*,[a, c]</sup>

The relaxation of long-lived states (LLS) corresponds to the slow return to statistical thermal equilibrium between symmetric and antisymmetric proton spin states. This process is remarkably sensitive to the presence of external spins and can be used to obtain information about partial unfolding of proteins. We detected the appearance of a destabilized conformer of ubiquitin when urea is added to the protein in its native state. This conformer shows increased mobility in the C-termi-

nus, which significantly extends the lifetimes of proton LLS magnetisation in Ser-65. These changes could not be detected by conventional measurements of  $T_1$  and  $T_2$  relaxation times of protons, and would hardly be sensed by carbon-13 or nitrogen-15 relaxation measurements. Conformers with similar dynamic and structural features, as revealed by LLS relaxation times, could be observed, in the absence of urea, in two ubiquitin mutants, L67S and L69S.

## 1. Introduction

Protein folding and unfolding are complex phenomena that remain difficult to characterize, despite numerous advancements in bioanalytical techniques. Proteins undergo conformational changes after their biosynthesis by the ribosome, and chaperons are believed to play a significant role in their folding. These changes can be described in terms of a trajectory through an energy landscape comprising partially folded states, finally leading to the native state.<sup>[1]</sup> Misfolding or partial unfolding can lead to various diseases.<sup>[2]</sup> Understanding protein folding is a prerequisite to gain insight into many cellular activities. Methods like MD simulations, NMR, fluorescence spectroscopy, and so forth, have been employed to shed some light on protein folding pathways, but numerous ambiguities remain.

Ubiquitin (Ub) is a particularly stable protein composed of 76 amino acids, which remains folded even up to 100 °C.<sup>[3]</sup> It is involved in marking proteins for proteosomal degradation and other cellular signalling pathways. In eukaryotic cells, ubiquitin is found either as a monomer or as polyubiquitin chains.<sup>[4]</sup> The structure of ubiquitin obtained from X-ray diffraction<sup>[5]</sup> and multidimensional NMR<sup>[6]</sup> shows that about 85% of the amino acids constitute its secondary structure, involving one  $\alpha$ -helix, one  $3_10$ -helix and five  $\beta$ -strands. The prevalence of secondary structure elements, its compactness, as well as its large hydrophobic core are likely the reasons behind the unusual stability of ubiquitin.

Ubiquitin has been used as a convenient model for both chemical<sup>[7]</sup> and thermal<sup>[8]</sup> unfolding studies. For this purpose, various methods, including two-dimensional (2D) NMR, 2D IR spectroscopy,<sup>[9]</sup> AFM,<sup>[10]</sup> and MD simulations have been used. NMR studies have sampled H/D exchange kinetics in ubiquitin,<sup>[11]</sup> some of them using SOFAST 2D experiments.<sup>[12]</sup> It was observed that H/D exchange of amide protons is the slowest

for residues in the  $\beta_1$ – $\beta_2$  strands and in the  $\alpha$ -helix, and noticeably faster in the less stable C-terminal  $\beta$ -strand of ubiquitin. Interestingly, a replacement of Leu-69 by a serine (L69S) in ubiquitin resulted in a dramatic, up to 650-fold increase in the H/D exchange rates in the  $\beta_5$  strand, indicating weakening of the H-bonding contacts between this strand and its neighbours.<sup>[12b]</sup> The partially-folded A state of Ub, which appears in a 60/40% methanol/water mixture at low pH, retains a native-like structure of the N-terminal  $\beta_1$ – $\beta_2$  strands and  $\alpha$ -helix, whereas the C-terminal  $\beta$ -strands switch to a structure with a predominantly helical character, as revealed by a study of the

[a] L. Fernandes, S. Hadji, Prof. P. R. Vasos  
Equipe de RMN des Substances d'Intérêt Biologique  
UMR 8601 CNRS, Université Paris Descartes  
Sorbonne Paris Cité, 45, rue des Saints Pères 75006, Paris (France)  
E-mail: Paul.Vasos@parisdescartes.fr

[b] Dr. R. Sarkar  
School of Chemistry  
University of Southampton  
Southampton SO17 1BJ (England)

[c] A. Bornet, Dr. P. Ahuja, Prof. G. Bodenhausen, Prof. P. R. Vasos  
Institut des Sciences et Ingénierie Chimiques  
Ecole Polytechnique Fédérale de Lausanne  
EPFL, Batochime, 1015 Lausanne (Switzerland)

[d] S. Y. Lee, Dr. A. Haririnia, Prof. D. Fushman  
Department of Chemistry & Biochemistry  
Center for Biomolecular Structure and Organization  
University of Maryland, College Park, MD 20742 (USA)

[e] Prof. G. Bodenhausen  
Département de Chimie  
Ecole Normale Supérieure  
24 Rue Lhomond, 75231, Paris Cedex 05 (France)

[f] Prof. G. Bodenhausen  
Université Pierre-et-Marie Curie, Paris (France)

[g] Prof. G. Bodenhausen  
CNRS, UMR 7203 (France)

backbone dynamics by NMR.<sup>[13]</sup> Cordier and Grzesiek<sup>[14]</sup> have shown, by measuring the temperature dependence of  $^3\text{h}J(^{15}\text{N}, ^{13}\text{CO})$  scalar coupling constants, that the H-bonds between the parallel  $\beta_1$ – $\beta_5$  strands are the least stable, with Glu-64→Gln-2 being the weakest H-bond. Molecular dynamics simulations were also used to study the kinetics of thermal unfolding of ubiquitin.<sup>[15]</sup> It was found that the  $\beta$ -strands are less stable than the  $\alpha$ -helix, the weakest being the strand  $\beta_5$  at the C-terminus. Free-energy surface calculations<sup>[16]</sup> show that at low temperatures the thermal unfolding occurs in steps: the strands  $\beta_3$ – $\beta_5$  are first disrupted, while the strands  $\beta_1$ – $\beta_2$  are unfolded later. Many questions remain open, however, especially regarding the early steps of the unfolding process.

The populations of long-lived states (LLS)<sup>[17]</sup> return to equilibrium with time constants  $T_{\text{LLS}}$  that can be much longer than spin-lattice relaxation time constants, for example,  $T_{\text{LLS}}/T_1 > 37$  in partially deuterated saccharides.<sup>[18]</sup> Long relaxation time constants  $T_{\text{LLS}}$  are observed in partially-deuterated molecules dissolved in deuterated solvents. It is known that hydrogen bonds are weakened in  $\text{D}_2\text{O}$ , but we expect the effect to be consistent throughout the protein after an equilibrium has been established, and conclusions on the relative stability of different protein segments drawn from relaxation time constants  $T_{\text{LLS}}$  in  $\text{D}_2\text{O}$  are therefore relevant. It is possible to excite LLS in two-spin systems of glycine residues of small peptides as well as in the mobile C-terminus of ubiquitin.<sup>[19]</sup> LLS have also been observed in some amino acids like serine, cysteine, aspartate, and so forth, where the isolated  $\text{H}^{\alpha}$  and the pair of  $\text{H}^{\beta}$  protons constitute a scalar-coupled three-spin system.<sup>[20]</sup>

LLS have long relaxation times because the main relaxation mechanism, that is, the dipolar interaction between the involved spins, does not significantly affect their lifetimes,<sup>[17c]</sup> while interactions with other magnetic nuclei do. The time constants  $T_{\text{LLS}}$  are therefore much more sensitive to the environment of these spins than  $T_1$  or  $T_2$  relaxation times and can thus provide information about the geometry of molecules.<sup>[21]</sup> We have measured LLS lifetimes in various amino acid residues of wild-type (WT) ubiquitin partly denatured by the addition of urea and by changing the pH, in order to obtain information about changes in structure and mobility during unfolding. In addition, we compared the values of relaxation time constants  $T_{\text{LLS}}$  in thermodynamically destabilized L69S and L67S mutants of ubiquitin<sup>[12b]</sup> with those of WT ubiquitin.

## 2. Results and Discussion

### 2.1. Ubiquitin Denaturation Using Urea

Decay time constants of long-lived states with observed ratios  $T_{\text{LLS}}/T_1 > 1$  are referred to as significantly enhanced lifetimes. LLS with significant lifetimes have been observed in the loose C-terminus of ubiquitin in its native state while singlet–triplet population differences of amino acids buried in the dense core of ubiquitin tend to have shorter  $T_{\text{LLS}}$  because of strong dipolar interactions with surrounding protons. We have observed that  $T_1 \approx 1$  s for most protons in ubiquitin. However, as proton  $T_1$ 's cannot be easily determined in proteins due to coupled multi-

exponential relaxation, we do not report  $T_{\text{LLS}}/T_1$  ratios. Changes in  $T_{\text{LLS}}$  are used to report on structural changes during unfolding.

Table 1 reports lifetimes  $T_{\text{LLS}}$  measured in the absence and in the presence of urea, at different pH values. The relaxation time constant  $T_{\text{LLS}}$  of the aliphatic protons of Gly-76 remains unchanged upon addition of 8 M urea, even upon changing the pH from 7 to 4.5. At 8 M urea and pH 3, the proton chemical shifts seen in TOCSY become similar to those of fully unfolded ubiquitin.<sup>[22]</sup>

**Table 1.** Lifetimes  $T_{\text{LLS}}$  for protons in Gly-76, Gly-75, and Ser-65 of WT ubiquitin in the absence and in the presence of urea, as a function of pH. The reported standard deviations are derived from 50 fits of the exponential decays  $I(t) = I_0 \exp(-t/T_{\text{LLS}})$ , adding random noise to the experimental signal intensities in proportion to the noise observed in the spectra. Lifetimes indicated by \* could not be measured due to spectral overlap.

Urea/M	pH	$T_{\text{LLS}}(\text{Gly-76})/\text{s}$	$T_{\text{LLS}}(\text{Gly-75})/\text{s}$	$T_{\text{LLS}}(\text{Ser-65})/\text{s}$
0	7	$6.5 \pm 0.4$	$6.3 \pm 0.2$	< 1
8	7	$6.4 \pm 0.3$	$3.8 \pm 0.6$	$12 \pm 1$
8	4.5	$6.4 \pm 0.3$	$2.9 \pm 0.1$	$11 \pm 1$
8	3	*	*	$11 \pm 1$

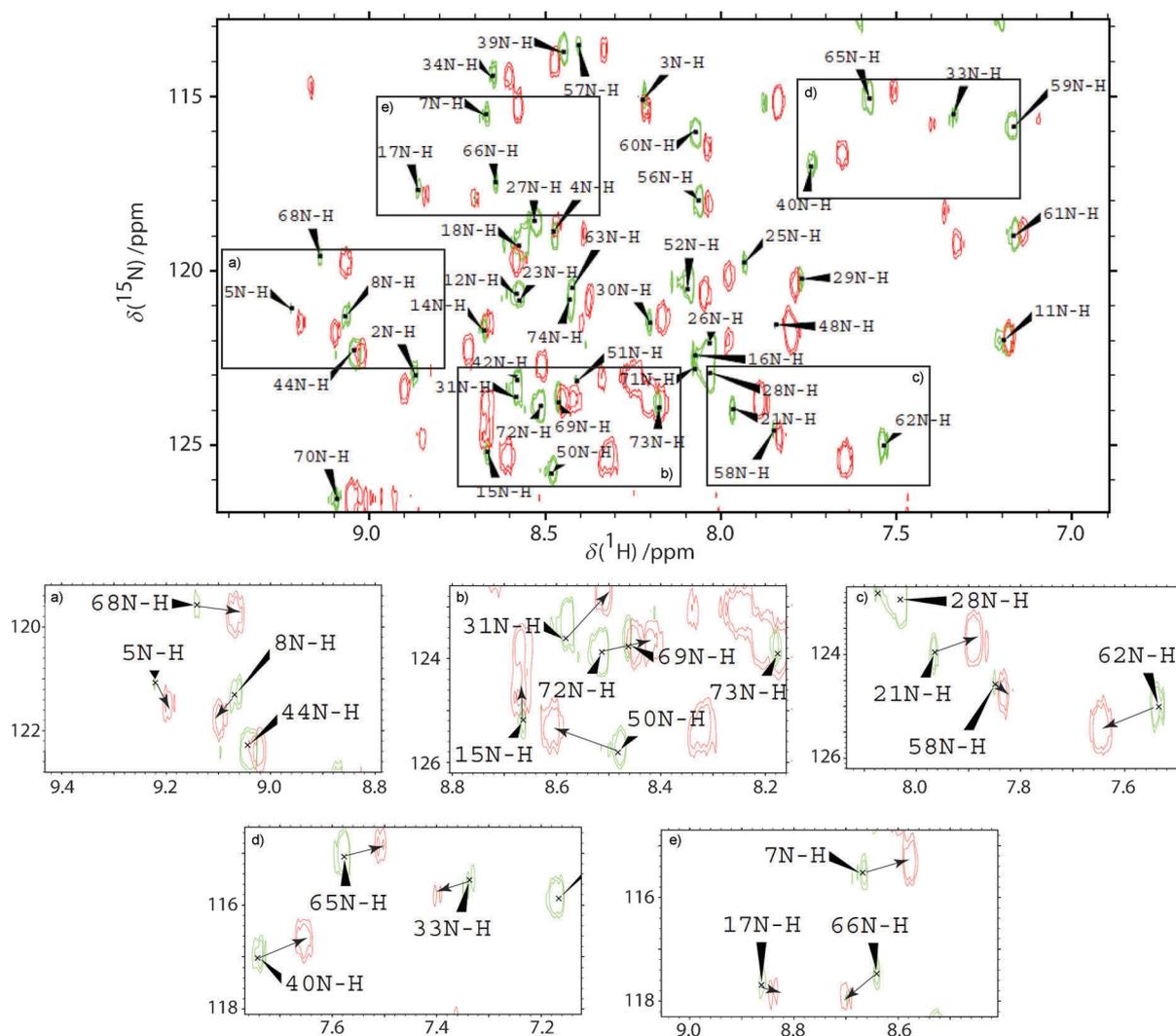
In the absence of any structural or dynamic changes that would induce an increase in  $T_{\text{LLS}}$ , these time constants are expected to become shorter, due to increased solvent viscosity in presence of urea<sup>[19,23]</sup> and to the increased radius of gyration of the partially unfolded protein in solution. In Gly-75,  $T_{\text{LLS}}$  decreases from 6.3 to 3.8 s upon addition of 8 M urea and further decreases to 2.9 s when the pH is lowered to 4.5. The decrease in  $T_{\text{LLS}}$  might be partly due to dipolar interactions with external protons arising from structural changes at the C-terminus. The side chain of Arg-74, for instance, may come closer to the protons of Gly-75 upon urea addition.

In Ser-65, we have observed a dramatic increase in singlet–triplet equilibration lifetimes, from  $T_{\text{LLS}} < 1$  s in the native state to  $T_{\text{LLS}} = 12$  s after addition of 8 M urea, while  $T_1 \approx 1$  s remains unchanged. The increase in  $T_{\text{LLS}}$  could indicate structural changes in the  $\beta_5$  strand which would allow Ser-65 to move out of the proton-rich core of ubiquitin.

Ubiquitin TOCSY<sup>[24]</sup> spectra at pH 7 do not change significantly after addition of 8 M urea, and information about structural changes induced by urea is difficult to obtain. The spectra remain the same down to pH 4, but the chemical shifts suddenly collapse when the pH drops from 4 to 3, thus indicating extensive denaturation.<sup>[22]</sup>

Figure 1 shows  $^{15}\text{N}$ - $^1\text{H}$  HSQC spectra of WT ubiquitin,<sup>[25]</sup> dissolved in 90/10%  $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$  at pH 7, before and after addition of 8 M urea. Figure 2 shows residues in the  $\beta$ -strand structure of regions of ubiquitin that feature significant differences in terms of the weighted chemical shifts<sup>[26]</sup>  $\Delta_{\text{av}} = [(\Delta\delta_{\text{HN}}^2 + \Delta\delta_{\text{N}}^2/25)/2]^{1/2}$ . It is interesting to remark that the HSQC signal of Gln-62, the H-bond partner of Ser-65, shifts considerably upon addition of urea.

Figure 3 shows signal intensities in LLS experiments using a sustaining interval  $\tau_{\text{LLS}} = 1$  s at pH 7 as a function of urea con-



**Figure 1.**  $^{15}\text{N}$ - $^1\text{H}$  HSQC spectra of WT ubiquitin (measured at  $^{15}\text{N}$  natural abundance) at pH 7 before (green) and after (red) addition of 8 M urea. The experiments were carried out at 18.8 T (800 MHz for protons) and  $T = 298$  K. Shown insets outline signals of residues undergoing significant shifts.

centration between 0 and 8 M. The  $T_{\text{LLS}}$  of various residues change after initial addition of urea but remain constant (see Table 1) when the urea concentration increases from 2 to 8 M. Changes in signal intensities result from changes in  $T_{\text{LLS}}$  and from sample dilution. Taking into consideration the errors introduced by spectral noise and pulse imperfections at different urea concentrations, the increase in intensity of the signal of Ser-65 can only be conservatively interpreted as indicating that a conformer with a significantly longer lifetime  $T_{\text{LLS}}$  progressively appears upon urea addition. The decrease in the signal intensities of Gly-75 and Gly-76 mainly reflects sample dilution.

## 2.2. Similarities with Ubiquitin Mutants L69S and L67S

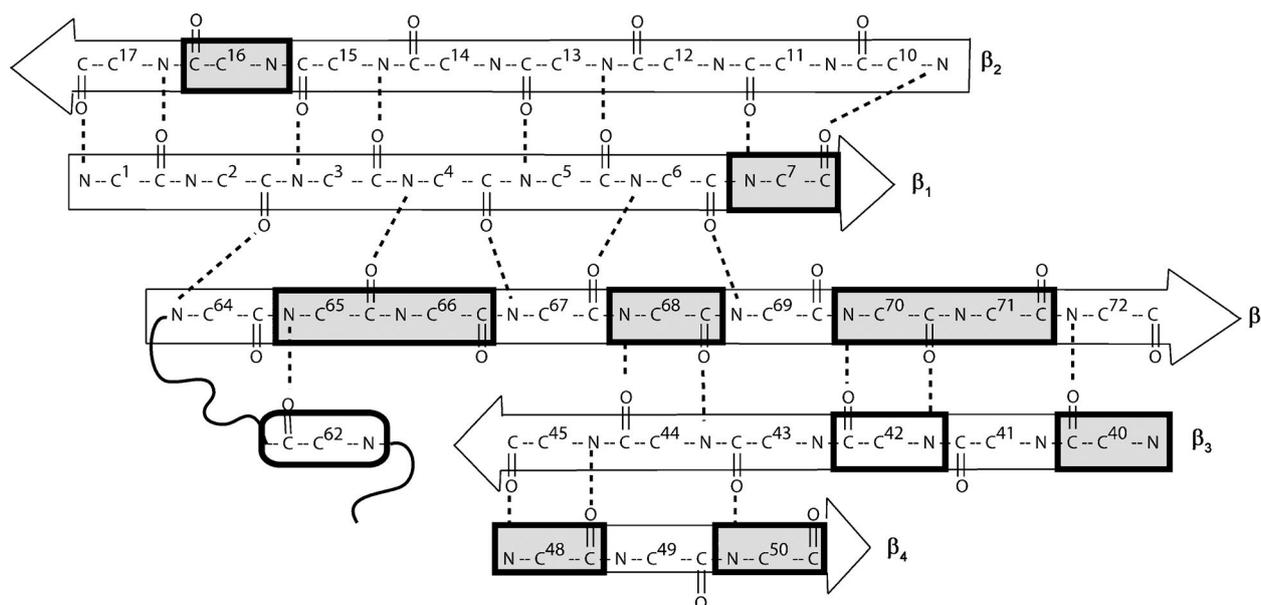
In two mutants of ubiquitin, L69S and L67S, the replacement of hydrophobic leucines by polar serines induces a loss of hydrophobic interactions, resulting in a lower thermodynamic stability of the protein, increased distances between the  $\alpha$ -helix and the  $\beta_3$  and  $\beta_5$  strands, as well as in increased rates of

H-D exchange in the  $\beta_5$  strand.<sup>[12b]</sup> Figure 4 shows the assignments of Ser-65 and Ser-69 signals in a TOCSY spectrum of L69S ubiquitin. The spectrum obtained by conversion of LLS into observable magnetisation (inset) shows that an LLS with significant lifetimes ( $T_{\text{LLS}} \gg T_1$ ) was excited and sustained in Ser-65.

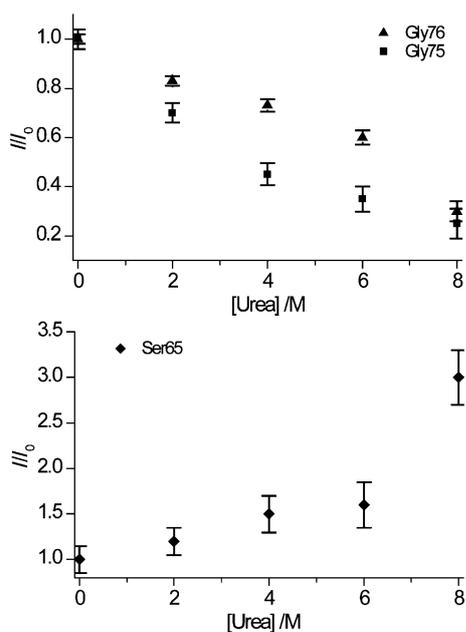
## 2.3. Transverse Relaxation Times

Table 2 shows a comparison between the lifetimes  $T_{\text{LLS}}$  of Gly-75, Gly-76, and Ser-65 in WT ubiquitin and its mutants at pH 7. In the mutants, a remarkably long  $T_{\text{LLS}} \approx 15$  s is observed in Ser-65. Analysis of the  $T_{\text{LLS}}$  lifetimes of Gly-75 and Gly-76 leads to the conclusion that the C-termini of both mutants have structural and dynamic similarities with WT ubiquitin at pH 7 and in the presence of 8 M urea.

Since the measurement of proton  $T_2$ 's is challenging in systems with homonuclear scalar couplings,<sup>[27]</sup> we measured instead  $T_{1\rho}$ 's of the  $\text{H}^\alpha$  protons<sup>[28]</sup> in Gly-75, Gly-76, and Ser-65 of



**Figure 2.** Residues in the  $\beta$ -strand structure of ubiquitin and selected H-bond partners. The residues that show weighted (see text) chemical shift differences larger than the average value for all the amino acids in the  $^{15}\text{N}$ - $^1\text{H}$  HSQC spectra of Figure 1 are marked by rectangles.



**Figure 3.** Intensities of signals of Gly-75, Gly-76 (top) and Ser-65 (bottom) as a function of the concentration of urea, using a constant sustaining interval  $\tau_{\text{LLS}} = 1$  s. Error bars reflect noise in the spectra. The Ser-65 signal intensity increases, while the Gly-75, Gly-76 signal intensities decrease.

**Table 2.** The lifetimes  $T_{\text{LLS}}$  of Gly-76, Gly-75, and Ser-65 in WT ubiquitin at pH 7 in the absence and in the presence of urea, compared with the corresponding lifetimes in L69S and L67S mutants in the absence of urea. \* Signal intensities were too weak to obtain a good fit.

Mutant	Urea [M]	$T_{\text{LLS}}$ (Gly-76)/s	$T_{\text{LLS}}$ (Gly-75)/s	$T_{\text{LLS}}$ (Ser-65)/s
WT	0	$6.5 \pm 0.4$	$6.3 \pm 0.2$	$< 1$
WT	8	$6.4 \pm 0.3$	$3.8 \pm 0.6$	$12 \pm 1$
L69S	0	$4.2 \pm 0.3$	$1.4 \pm 0.1$	$15.0 \pm 0.2$
L67S	0	$2.9 \pm 0.3$	*	$16.4 \pm 0.2$

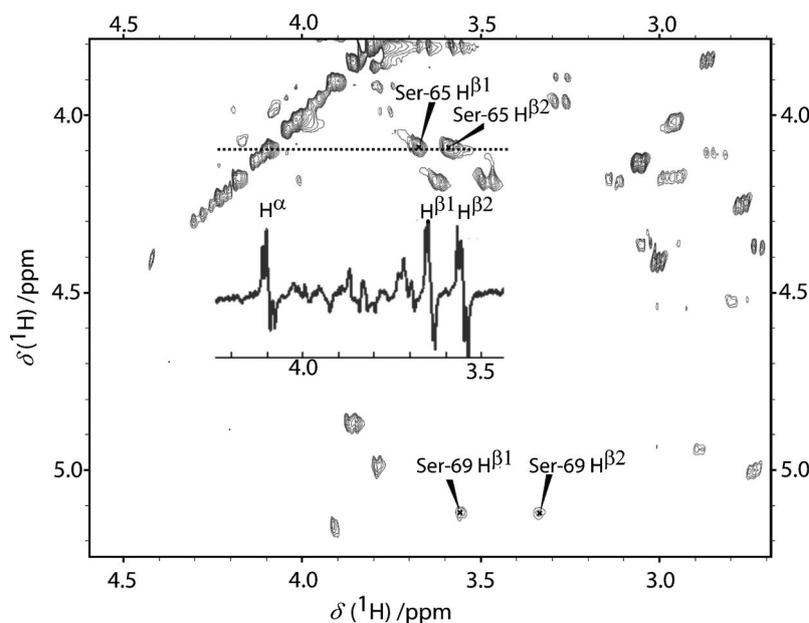
**Table 3.** Lifetimes  $T_{1\&\#961}$  and  $T_{\text{LLS}}$  in various amino acids of WT ubiquitin and its L69S mutant at pH 7 and various urea concentrations. Lifetimes indicated by \* were not measured; \*\* signal intensities were too weak to obtain a good fit.

Mutant	Residue	$T_{1p}$ [ms] [Urea] = 0 M	$T_{1p}$ [ms] [Urea] = 8 M	$T_{\text{LLS}}$ [s] [Urea] = 0 M	$T_{\text{LLS}}$ [s] [Urea] = 8 M
WT	Gly-75	$110 \pm 2$	$115 \pm 2$	$6.3 \pm 0.2$	$3.85 \pm 0.6$
WT	Gly-76	$195 \pm 2$	$190 \pm 2$	$6.5 \pm 0.4$	$6.41 \pm 0.3$
WT	Ser-65	*	*	*	$12 \pm 1$
L69S	Gly-75	**	*	$1.4 \pm 0.1$	*
L69S	Gly-76	$120 \pm 1$	*	$4.2 \pm 0.3$	*
L69S	Ser-65	$200 \pm 1$	*	$15.0 \pm 0.2$	*

WT ubiquitin as a function of the urea concentration. Similar measurements were carried out for the L69S mutant of ubiquitin. For this purpose, a LLS sequence was inserted as a filter prior to the actual  $T_{1p}$  pulse sequence. Only states that have a sufficiently long  $T_{\text{LLS}}$  survive this filter. Furthermore, a  $J$ -filter consisting of a combination of  $\pi$ -pulses and gradients was inserted, in order to dephase undesired coherences from other residues.<sup>[29]</sup> Table 3 gives a comparison of the values of  $T_{1p}$  and

$T_{\text{LLS}}$  in Gly-76 and Gly-75 of WT ubiquitin at pH 7, before and after addition of 8 M urea. No significant changes in  $T_{1p}$ 's were observed upon addition of urea, while  $T_{\text{LLS}}$  in Gly-75 changes significantly.

The  $T_{1p}$  of Ser-65 is longer than that of Gly-76 in the L69S mutant, indicating that Ser-65 is quite mobile, which explains why a very long  $T_{\text{LLS}} = 15.0 \pm 0.2$  s is obtained for this amino acid residue.



**Figure 4.** Region of a  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  TOCSY spectrum of the L69S mutant of ubiquitin. The chemical shifts of Ser-69 and Ser-65 are shown. The experiments were carried out at 14.1 T (600 MHz for protons) with a mixing interval  $\tau_m = 80$  ms. The inset shows a 1D spectrum of L69S ubiquitin obtained after transfer into observable magnetisation from an LLS comprising the three protons  $\text{H}^\alpha$ ,  $\text{H}^{\beta 1}$ , and  $\text{H}^{\beta 2}$  of Ser-65. The LLS was sustained during  $\tau_{\text{LLS}} = 1$  s by a train of Sinc pulses.

These observations show how ubiquitin is affected by urea. Under these conditions, the residues in the  $\beta_1$ - $\beta_2$  hairpin and between the parallel  $\beta_1$ - $\beta_5$  strands are the first to undergo changes in their chemical environment, as can be appreciated when comparing HSQC spectra at pH 7 in the presence and absence of urea (Figure 1 and 2). The increase in the  $T_{\text{LLS}}$  of Ser-65 after addition of urea points to an increased  $\beta_5$  mobility due to the weakening of H-bond interactions in the parallel  $\beta_1$ - $\beta_5$  strands, an observation which is in agreement with earlier reports about the unfolding pathways of ubiquitin, the  $\beta$ -strand structure of ubiquitin at its C-terminus being the least stable.

### 3. Conclusions

The lifetimes of LLS, more sensitive to structural changes than proton relaxation time constants  $T_1$ ,  $T_2$ , or  $T_{1\rho}$  can be used as a probe to study protein unfolding. We could detect a partly unfolded conformer where the H-bonds between the  $\beta_1$  and  $\beta_5$  strands are weakened. We found structural and dynamic similarities between partly-denatured WT ubiquitin and thermodynamically destabilized mutants L69S or L67S in their native state. We were able to excite LLS in the labile C-terminal part of native ubiquitin and in one inner residue of destabilised proteins. We expect to be able to sustain LLS in protein samples using various deuteration techniques<sup>[30]</sup> or in proteins extracted from bacteria grown in deuterated environments to which protonated Gly are added. Since these proteins contain selectively-protonated Gly, and, due to the cellular metabolism, Ser residues, this practice may extend the scope of protein dynamics studied by LLS.

### Experimental Section

The  $T_{\text{LLS}}$  and 2D-TOCSY experiments on ubiquitin (2 mM in  $\text{D}_2\text{O}$  at 298 K) were carried out at 600 and 800 MHz. Gaseous nitrogen was bubbled through the samples for ten minutes prior to all experiments in order to reduce the concentration of dissolved oxygen. Before addition, urea was lyophilized and dissolved in  $\text{D}_2\text{O}$  twice to exchange labile protons by deuterons. The pH of the solution was adjusted by adding concentrated HCl. LLS experiments were run using the method described by Sarkar et al.<sup>[18]</sup> Presaturation pulses of 1 s were applied before the beginning of the sequence. During the sustaining period, the carrier was placed at the water frequency, and Sinc pulses<sup>[31]</sup> were used to sustain the LLS over a broad bandwidth. For each LLS experiment, 128 transients were acquired using a recovery delay of 10 s and an acquisition time of 2.73 s. Experimental  $T_{\text{LLS}}$  values were obtained by fitting spectral intensities for 8 increments  $\tau_{\text{LLS}} = 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15$  s for Gly-75, 76 and  $\tau_{\text{LLS}} = 1, 3, 6, 10, 15, 21, 28, 36$  s for Ser-65 to mono-exponentially decaying functions. 2D  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC experiments were recorded at 800 MHz on a sample of ubiquitin (2 mM dissolved in 90/10%  $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ ).

### Acknowledgements

The authors thank Martin Blackledge (Institut de Biologie Structurale Jean-Pierre Ebel, Grenoble) for useful suggestions. Martial Rey provided valuable technical assistance. This work was supported by the Swiss National Science Foundation ("Ambizione" grant PZOOP2 121928 to P.V. and FNRS grant 200020 124694 to G.B. and P.V.), the Ecole Polytechnique Fédérale de Lausanne (EPFL), the Swiss Commission for Technology and Innovation (CTI grant 9991.1 PFIW-IW to G.B., Paul Dyson, Jean-Philippe Ansermet, and P.V.), the French CNRS, and the National Institutes of Health (NIH grant GM065334 to D.F.). P.V. thanks the Faculty of Basic Sciences, EPFL, for financial support.

**Keywords:** long-lived states • mutations • NMR spectroscopy • proteins • singlet states

- [1] C. M. Dobson, M. Karplus, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1999**, *9*, 92–101.
- [2] A. R. Fersht, V. Daggett, *Cell* **2002**, *108*, 573–582.
- [3] B. Ibarra-Molero, V. V. Loladze, G. I. Makhatadze, J. M. Sanchez-Ruiz, *Biochemistry* **1999**, *38*, 8138–8149.
- [4] C. M. Pickart, D. Fushman, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2004**, *8*, 610–616.
- [5] S. Vijaykumar, C. E. Bugg, W. J. Cook, *J. Mol. Biol.* **1987**, *194*, 531–544.
- [6] a) G. Cornilescu, J. L. Marquardt, M. Ottiger, A. Bax, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 6836–6837; b) N. A. Lakomek, O. F. Lange, K. F. A. Walter, C. Fares, D. Egger, P. Lunkenheimer, J. Meiler, H. Grubmüller, S. Becker, B. L. de Groot, C. Griesinger, *Biochem. Soc. Trans.* **2008**, *36*, 1433–1437.

- [7] a) S. Khorasanizadeh, I. D. Peters, T. R. Butt, H. Roder, *Biochemistry* **1993**, *32*, 7054–7063; b) S. Khorasanizadeh, I. D. Peters, H. Roder, *Nat Struct Biol* **1996**, *3*, 193–205; c) B. A. Krantz, T. R. Sosnick, *Nat. Struct. Biol.* **2000**, *39*, 11 696–11 701.
- [8] M. Noronha, H. Gerbelova, T. Q. Faria, D. N. Lund, D. A. Smith, H. Santos, A. L. Macanita, *J. Phys. Chem. B* **2010**, *114*, 9912–9919.
- [9] H. S. Chung, Z. Ganim, K. C. Jones, A. Tokmakoff, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2007**, *104*, 14237–14242.
- [10] F. Gräter, H. Grubmüller, *J. Struct. Biol.* **2007**, *157*, 557–569.
- [11] E. C. Johnson, G. A. Lazar, J. R. Desjarlais, T. M. Handel, *Structure Struct. Fold Des.* **1999**, *7*, 967–976.
- [12] a) P. Schanda, V. Forge, B. Brutscher, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2007**, *104*, 11257–11262; b) A. Haririnia, R. Verma, N. Purohit, M. Z. Twarog, R. J. Deshaies, D. Bolon, D. Fushman, *J. Mol. Biol.* **2008**, *375*, 979–996.
- [13] B. Brutscher, R. Brüschweiler, R. R. Ernst, *Biochemistry* **1997**, *36*, 13043–13053.
- [14] F. Cordier, S. Grzesiek, *J Am Chem. Soc* **1999**, *121*, 1601–1602.
- [15] a) A. Krishnan, A. Giuliani, J. P. Zbilut, M. Tomita, *PLoS One* **2008**, *3*, e2149; b) A. Das, C. Mukhopadhyay, *J. Chem. Phys.* **2007**, *127*, 165103.
- [16] H. S. Chung, A. Tokmakoff, *Proteins* **2008**, *72*, 488–497.
- [17] a) M. Carravetta, O. G. Johannessen, M. H. Levitt, *Phys. Rev. Lett.* **2004**, *92*, 153003; b) M. Carravetta, M. H. Levitt, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 6228–6229; c) M. Carravetta, M. H. Levitt, *J. Chem. Phys.* **2005**, *122*, 214505; d) G. Pileio, M. H. Levitt, *J. Chem. Phys.* **2009**, *130*, 214501.
- [18] R. Sarkar, P. R. Vasos, G. Bodenhausen, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 328–334.
- [19] P. Ahuja, R. Sarkar, P. R. Vasos, G. Bodenhausen, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 7498–.
- [20] P. Ahuja, R. Sarkar, P. R. Vasos, G. Bodenhausen, *ChemPhysChem* **2009**, *10*, 2217–2220.
- [21] a) M. C. D. Tayler, S. Marie, A. Ganesan, M. H. Levitt, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 8225; b) A. K. Grant, E. Vinogradov, *J. Magn. Reson.* **2008**, *193*, 177–190.
- [22] W. Peti, L. J. Smith, C. Redfield, H. Schwalbe, *J. Biomol. NMR* **2001**, *19*, 153–165.
- [23] P. Ahuja, R. Sarkar, P. R. Vasos, G. Bodenhausen, *J. Chem. Phys.* **2007**, *127*, 134112.
- [24] D. Marion, A. Bax, *J. Magn. Reson.* **1988**, *80*, 528–533.
- [25] G. Bodenhausen, D. J. Ruben, *Chem. Phys. Lett.* **1980**, *69*, 185–189.
- [26] S. Grzesiek, A. Bax, G. M. Clore, A. M. Gronenborn, J. S. Hu, J. Kaufman, I. Palmer, S. J. Stahl, P. T. Wingfield, *Nat. Struct. Biol.* **1996**, *3*, 340–345.
- [27] a) T. F. Segawa, B. Baishya, G. Bodenhausen, *ChemPhysChem* **2010**, *11*, 3343–3354; b) B. Baishya, T. F. Segawa, G. Bodenhausen, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 17538–17539.
- [28] J. W. Peng, V. Thanabal, G. Wagner, *J. Magn. Reson.* **1991**, *94*, 82–100.
- [29] R. Sarkar, P. Ahuja, P. R. Vasos, A. Bornet, O. Wagnières, G. Bodenhausen, *Prog. Magn. Reson. Spectrosc.* **2011**, *59*, 83–90.
- [30] a) R. Lichtenecker, M. L. Ludwiczek, W. Schmid, R. Konrat, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 5348–5349; b) N. Sibille, X. Hanouille, F. Bonachera, D. Verdegem, I. Landrieu, J. M. Wieruszkeski, G. Lippens, *J. Biomol. NMR* **2009**, *43*, 219–227.
- [31] R. Sarkar, P. Ahuia, D. Moskau, P. R. Vasos, G. Bodenhausen, *ChemPhysChem* **2007**, *8*, 2652–2656.

Received: May 13, 2011

Published online on August 31, 2011

## Résumé

---

La compréhension des interactions intra- et inter-moléculaires à l'échelle atomique représente un enjeu scientifique important. A l'heure actuelle, les techniques de RMN ont déjà prouvé leur efficacité pour l'analyse de ces interactions *in vitro*, dans les solutions tampons. Toutefois, il a également été montré que la plupart des biomolécules ont une structure et une dynamique différentes *in vivo*, à l'intérieur des cellules, de celle *in vitro*. Il est donc crucial d'analyser les biomolécules dans leur milieu naturel, la cellule. Récemment, les progrès dans le domaine de la RMN dans les cellules ont permis de mieux comprendre la dynamique et les interactions des biomolécules présentes dans le milieu cellulaire complexe. Cependant, la biomolécule étudiée étant présente en faibles concentrations, elle possède un faible signal sur le spectre RMN, qu'il est difficile de suivre. De plus, du fait de la forte viscosité du milieu cellulaire, la relaxation rapide de l'aimantation transverse se traduit par un élargissement des raies spectrales. L'utilisation des états de spin à longs temps de vie et de la Polarisation Dynamique Nucléaire suivie par la dissolution de l'échantillon (dissolution-DNP) pourraient permettre de pallier aux problèmes d'élargissement de raies et de sensibilité.

L'objectif de ce travail de thèse a été d'explorer les bénéfices des ces avancées récentes de la RMN pour l'étude des petites molécules, peptides et protéines à l'intérieur des cellules. Pour la protéine c-Src, qui appartient à la classe des protéines intrinsèquement désordonnées (IDP), la dynamique de l'ensemble des conformations de l'extrémité N-terminale a été suivie utilisant des états de spin à longs temps de vie LLS. Le signal du noyau de carbone-13 de la molécule de pyruvate a été augmenté utilisant la Polarisation Dynamique Nucléaire (DNP) afin de mieux l'observer dans le milieu cellulaire. Un peptide représentatif pour la partie active d'une autre protéine, IκBα, a été introduit dans des cellules HepG2 par l'électroporation. Les observations faites lors des ces expériences sont discutées dans la perspective de faciliter les études RMN des biomolécules à l'intérieur des cellules.

**Mots clefs :** *RMN, Relaxation, LLS, LLC, c-Src, IDP, IκBα, dissolution-DNP, RMN dans les cellules*

## Abstract

---

Most NMR studies are carried out *in vitro*, but the structure and dynamics of some biomolecules inside cells differ from those *in vitro*. It thus becomes interesting to analyze biomolecules such as proteins in their natural environment: the cell. Recent progress of *in cell* NMR allowed to better understand the behaviour of proteins: their dynamics and their interactions with other biomolecules in the cell. But the low concentration of proteins leads to low signal intensity. Moreover, the viscosity of the environment induces faster transverse relaxation, resulting in line broadening for proteins signals. The use of the Long-Lived States and Coherences (LLS and LLC, respectively) as well as dissolution Dynamic Nuclear Polarization (dissolution-DNP) can improve NMR observations in cells. LLS were used to understand and characterize the structure of the N-terminal domain of c-Src, which is intrinsically disordered. To follow the phosphorylation of proteins, a first preliminary study of a 21-aa peptides derived from IκBα electroporated into HepG2 cell lines was carried out.

**Keywords:** *NMR, Relaxation, LLS, LLC, c-Src, IDP, Phosphorylation, IκBα, DNP, HepG2*