



**HAL**  
open science

# Développements méthodologiques pour l'analyse d'équilibres conformationnels par résonance magnétique nucléaire

Ghada Aloui

► **To cite this version:**

Ghada Aloui. Développements méthodologiques pour l'analyse d'équilibres conformationnels par résonance magnétique nucléaire. Chimie analytique. Université Paris Saclay (COMUE); Université de Carthage (Tunisie), 2019. Français. NNT : 2019SACLS199 . tel-02504700

**HAL Id: tel-02504700**

**<https://theses.hal.science/tel-02504700>**

Submitted on 11 Mar 2020

**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.

# Développements Méthodologiques Pour l'Analyse d'Equilibres Conformationnels par Résonance Magnétique Nucléaire

Thèse de doctorat de l'Université de Carthage  
et l'Université Paris-Saclay  
préparée à l'Université Paris-Sud,  
Institut de Chimie Moléculaire et des Matériaux d'Orsay

École doctorale n°571 Sciences chimiques :  
molécules, matériaux, instrumentation et biosystèmes (2MIB)  
Spécialité de doctorat: chimie

Thèse présentée et soutenue à Orsay, le 18 juillet 2019, par

**Ghada Aloui**

Composition du Jury :

Denis Merlet Professeur, Université Paris-Saclay (UMR 8182)	Président
Patrick Giraudeau Professeur, Université de Nantes (UMR 6230)	Rapporteur
Mohamed Taieb Ben Dhia Professeur, Université de Tunis	Rapporteur
Sabine Hediger Directrice de Recherche, CEA Grenoble (IRIG/MEM/LRM)	Examinatrice
Nicolas Giraud Professeur, Université de Paris (UMR 8601)	Directeur de thèse
Soufiane Touil Professeur, Université de Carthage	Co-Directeur de thèse
Sondes Bouabdallah Maître de Conférences, Université de Carthage	Invitée



---

## REMERCIEMENTS

---

Ce travail a été effectué dans le laboratoire de RMN en milieu orienté, Université Paris-Saclay, en collaboration avec le laboratoire des composés Hétéro-Organiques et Matériaux Nanostucturés à l'Université de Carthage.

A l'issue de ces années de thèse, je tiens tout d'abord à remercier le Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique –Tunisie pour avoir financé ce projet.

Je tiens aussi à remercier les membres du jury pour avoir accepté de juger ce travail.

Je remercie le Professeur Denis Merlet qui m'a fait l'honneur de présider le jury, les Professeurs Patrick Giraudeau et Mohamed Taieb ben Dhia qui se sont montrés disponibles pour rapporter cette étude. Merci également au Dr. Sabine Hediger qui a accepté d'examiner ce travail et au Dr. Sondes Bouabdallah, invitée du jury.

Mes plus sincères remerciements vont ensuite à mon directeur de thèse, le Professeur, Nicolas Giraud, qui m'a permis de réaliser ce travail et qui m'a soutenue pendant ces années. Il a su me guider et me faire partager ses connaissances de la phase expérimentale à la phase rédactionnelle. Il a toujours été à l'écoute de mes nombreuses interrogations.

Je suis également infiniment reconnaissante envers mon co-directeur de thèse, le Professeur, Soufiane Touil, qui m'a été d'un grand soutien tout au long de mon travail de thèse. Je tiens à le remercier pour la confiance qu'il m'a témoignée en m'intégrant dans son laboratoire.

J'adresse également mes remerciements à Jonathan Farjon pour son aide précieuse tout au long de mon doctorat, notamment pour sa disponibilité constante et pour la relecture du manuscrit.

Je tiens également à remercier les membres de l'équipe avec lesquels j'ai collaboré pendant ma thèse, Jean-Pierre Baltaze, José Enrique Herbert qui ont consacré du temps pour m'apporter des connaissances nouvelles.

Je remercie également les membres du laboratoire LCBPT, Université de Paris, pour la bonne ambiance.

Je veux également remercier mes collègues à l'Institut de Chimie Moléculaire et des Matériaux d'Orsay et à la faculté des Sciences de Bizerte.

Enfin, j'adresse mes plus sincères remerciements à ma famille et tout particulièrement mes parents Mohamed et Saïda, mon frère Ghaith et ma sœur Rihab qui me soutiennent et m'encouragent depuis toujours.



---

# Table des Matières

---

<b>REMERCIEMENTS</b>	<b>3</b>
<b>TABLE DES MATIERES</b>	<b>5</b>
<b>LISTE DES ABREVIATIONS</b>	<b>9</b>
<b>PREAMBULE</b>	<b>10</b>
<b>CHAPITRE I. INTRODUCTION</b>	<b>13</b>
<b>I. Les Inhibiteurs de l'Enzyme de Conversion de l'Angiotensine I (IECA)</b>	<b>14</b>
I.A Le système-rénine-angiotensine-aldostérone	15
I.B Angiotensine II	16
I.C L'Enzyme de Conversion de l'Angiotensine I	16
<b>II. Les inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine</b>	<b>17</b>
II.A Définition	17
II.B Mécanisme d'action	17
II.C Propriétés pharmacocinétiques	19
II.D Equilibre conformationnel S-cis/S-trans des antihypertenseurs à liaison amide	21
<b>III. Rappel : RMN et relaxation</b>	<b>23</b>
III.A Bref historique : du principe de résonance à la spectroscopie de corrélation	23
III.B Relaxation nucléaire	25
<b>IV. L'échange chimique</b>	<b>26</b>
IV.A Echelles de temps et influence sur l'analyse RMN	26
IV.B Méthodes expérimentales pour l'analyse de l'échange chimique par RMN	29
IV.C Etude de l'expérience EXSY	30
<b>V. Expériences RMN avec encodage spatial.</b>	<b>31</b>
V.A Impulsions polychromatiques, « sélectives », et encodées spatialement	31
V.B Gradient de champ magnétique	33
V.C La méthode Zangger-Sterk (ZS)	34



<b>VI. Principe de la RMN « pure shift »</b>	<b>34</b>
VI.A Méthode Zangger-Sterk pour l'acquisition de spectres « pure shift »	35
VI.B Méthode PSYCHE	36
VI.C Application de la méthode « pure shift » à l'expérience TOCSY	37
<b>VII. L'échantillonnage non uniforme du signal</b>	<b>38</b>
<b>VIII. Introduction du sujet</b>	<b>40</b>
<b>CHAPITRE II. ETUDE PRELIMINAIRE DU TRANDOLAPRIL</b>	<b>42</b>
<b>I. Spectroscopie RMN 1D : influence de l'échange conformationnel</b>	<b>43</b>
<b>II. Spectroscopie de corrélation 2D</b>	<b>44</b>
<b>III. Spectroscopie EXSY</b>	<b>46</b>
<b>IV. Spectroscopie RMN « pure shift »</b>	<b>50</b>
IV.A Spectre 1D Push-PSYCHE	50
IV.B Spectre 1D Push-ZS	52
IV.C Comparaison des méthodes ZS et PSYCHE	54
IV.D Spectre TOCSY 2D « pure shift »	55
IV.E Attribution	57
<b>CHAPITRE III. MISE EN ŒUVRE D'UNE EXPERIENCE EXSY « PURE SHIFT »</b>	<b>59</b>
<b>I. Développement méthodologique : implémentation d'un découplage homonucléaire dans l'expérience EXSY</b>	<b>60</b>
I.A Spectre EXSY 2D « pure shift » en F2	60
I.B Spectre EXSY 2D « pure shift » en F1	67
I.C Spectre EXSY 2D « pure shift » en F2 avec méthode ZS	69
I.D Comparaison entre les différentes approches	70
<b>II. Validation d'une méthode d'analyse de l'échange conformationnel</b>	<b>71</b>
II.A Détermination des vitesses d'échange $k_{AB}$ et $k_{BA}$	71
II.B Détermination des énergies d'activation $E_{AB}$ et $E_{BA}$	75
<b>III. Etude de l'implémentation d'un échantillonnage non uniforme</b>	<b>76</b>
III.A Expérience 2D EXSY avec échantillonnage non uniforme (NUS)	77
III.B Détermination des vitesses d'échange $k_{AB}$ et $k_{BA}$	79
I.A Détermination des énergies d'activation $E_{AB}$ et $E_{BA}$	85
<b>CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES</b>	<b>88</b>
<b>REFERENCES</b>	<b>92</b>

<b>ANNEXES</b>	<b>96</b>
<b>IV. Aperçu sur l'analyse des spectres EXSY</b>	<b>97</b>
<b>V. Expériences EXSY (standard-Psyche)</b>	<b>102</b>
V.A Spectre EXSY enregistrés à 320 K	104
V.B Spectre EXSY enregistrés à 310 K	117
V.C Spectre EXSY enregistrés à 300 K	126
V.D Spectre EXSY enregistrés à 290 K	136
V.E Spectre EXSY enregistrés à 280 K	140
<b>VI. Analyse des paramètres d'échange et de relaxation.</b>	<b>145</b>
VI.A EXSY standard	145
VI.B EXSY pure shift (Psyche)	148
VI.C Distributions des vitesses d'échange	151
<b>VII. PSYCHE EXSY Pulse Sequence</b>	<b>154</b>
<b>VIII. Aperçu sur l'analyse des spectres EXSY-NUS</b>	<b>157</b>
VIII.A 5 Spectre EXSY enregistrés à 320 K	162
VIII.B Spectre EXSY enregistrés à 310 K	168
VIII.C Spectre EXSY enregistrés à 300 K	179
VIII.D Spectre EXSY enregistrés à 290 K	187
VIII.E Spectre EXSY enregistrés à 280 K	193
<b>IX. Analyse des paramètres d'échange et de relaxation.</b>	<b>196</b>
IX.A EXSY NUS	196
I.A Distributions des vitesses d'échange	200
<b>X. Spectres RMN du maléate d'énalapril</b>	<b>207</b>



**Université Paris-Saclay**

Espace Technologique / Immeuble Discovery

Route de l'Orme aux Merisiers RD 128 / 91190 Saint-Aubin, France



---

## LISTE DES ABRÉVIATIONS

---

ACE : Inhibiteurs de l'enzyme de conversion

Ang I : Angiotensine I

Ang II : Angiotensine II

COSY: Correlation SpectroscopY

DFT: Density Functional Theory

EXSY : Exchange SpectroscopY

HMBC: Heteronuclear Multiple Bond Correlation

HSQC: Heteronuclear Single Quantum Correlation

IECA : Inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine

NOESY : Nuclear Overhauser Effect SpectroscopY

NUS: Non-Uniform Sampling

Ppm: Partie par millions

PSYCHE: « pure shift » Yielded by Chirp Excitation

RAS: rénine- angiotensine- aldostérone

RMN : Résonance magnétique Nucléaire

TF: Transformée de Fourier

TOCSY: TOtal Correlation SpectroscopY

ZS: Zangger-Sterk



---

## PRÉAMBULE

---

La spectroscopie de résonance magnétique nucléaire (RMN) s'est imposée comme un outil unique pour sonder la structure et la dynamique d'un panel très large d'assemblages moléculaires. Les développements méthodologiques effectués depuis des années, associés aux progrès considérables accomplis dans le domaine des aimants et des sondes qui équipent les spectromètres modernes, ont permis l'émergence d'une grande variété d'expériences haute-résolutions ayant ouvert la voie vers une mesure précise des interactions au sein de grands systèmes de spins. Ces interactions constituent autant d'observables qui sont particulièrement utiles pour contraindre les simulations les plus complexes, permettant ainsi de décrire à l'échelle atomique les processus mis en jeu au sein d'une grande variété d'espèces chimiques. L'équipe RMN dirigée par Nicolas Giraud explore depuis plusieurs années diverses méthodes destinées à repousser les limites de résolution des spectres RMN qui peuvent être acquis sur des échantillons complexes. Elle a notamment récemment développé un concept original qui consiste en l'acquisition parallèle de différentes expériences en utilisant une seule et même bobine de détection. La résolution obtenue par ce type d'approche sur les spectres de RMN du proton  $^1\text{H}$  permet d'envisager l'analyse de systèmes moléculaires tels que des molécules subissant un équilibre conformationnel qui restaient jusque-là plus difficilement accessibles par l'analyse de ce noyau. En effet, si d'un côté les noyaux  $^1\text{H}$  constituent des sondes extrêmement puissantes et abondantes de la structure locale des molécules, en revanche le grand nombre de couplages homonucléaires qu'ils partagent en général contribuaient jusqu'à présent à rendre difficile l'analyse fine de leurs spectres dès que la taille de la molécule étudiée grandit.

Mon travail de thèse s'inscrit dans ce contexte et a pour objectifs : i) le développement méthodologique d'expériences RMN destinées à améliorer l'étude de l'échange conformationnel et ii) leur application à des composés thérapeutiques, tels que le Trandolapril<sup>®</sup>. Ces molécules présentent un fort enjeu analytique, notamment en raison de leur activité biologique. Ils appartiennent à la famille des inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine (IECA) qui empêchent la transformation de l'angiotensine I en angiotensine II, un fort vasoconstricteur. Or, cette molécule peut subir un processus d'échange conformationnel qui peut influencer ses propriétés. Cette thèse s'inscrit donc dans l'idée de développer des expériences de type EXSY pour étudier la dynamique d'échange du Trandolapril dans des conditions expérimentales où le régime dynamique est suffisamment lent pour être accessible par les approches développées. Notre travail porte plus particulièrement sur le développement méthodologique de différentes approches de RMN dite « pure shift » pour améliorer la résolution des spectres EXSY et en extraire des paramètres cinétiques et thermodynamiques sur l'équilibre conformationnel. Cette molécule a été utilisée comme modèle pour mettre en place puis valider un protocole



d'analyse par RMN ultra-haute-résolution de processus dynamiques allant de l'isomérisation à l'équilibre conformationnel. De nouvelles séquences d'impulsions ont été conçues et mises en œuvre pour adapter le protocole à l'extraction complètement résolue des corrélations permettant de sonder efficacement la dynamique d'échange.

Il faut préciser ici qu'ayant effectué mes études universitaires en Tunisie où le domaine de la RMN est peu développé, cette cotutelle m'a permis d'acquérir les connaissances théoriques et expérimentales de cette spectroscopie nécessaire pour pouvoir réaliser ce projet. Ce mémoire est donc structuré en trois chapitres qui reflètent à la fois le travail accompli, et les connaissances acquises. Le premier chapitre est, en partie, consacré à une étude bibliographique sur l'inhibiteur de l'enzyme de conversion Trandolapril, son activité biologique, ses propriétés thérapeutiques. Le deuxième chapitre porte sur la caractérisation des deux conformères S-cis/S-trans du Trandolapril. Le troisième chapitre, est essentiellement axé sur l'étude de l'échange conformationnel, et plus généralement d'un processus d'échange chimique en régime lent par RMN. Nous présentons une approche basée sur la RMN « pure shift » pour développer une expérience « Push-EXSY » afin d'améliorer la résolution des spectres de corrélation EXSY. Plusieurs techniques d'acquisition ou de traitement du signal seront étudiées pour améliorer la qualité des données ou accélérer la vitesse d'analyse. Ces résultats sont validés par la mise au point d'un protocole d'analyse de la qualité des données spécifiques.



---

## CHAPITRE I. INTRODUCTION

---



Les maladies cardiovasculaires sont traitées par divers types de médicaments dont l'activité pharmacologique est classée selon les modes suivants<sup>1</sup> :

- Les  $\beta$ -bloquants
- Les inhibiteurs d'acétylcholinestérase
- Les inhibiteurs de l'enzyme de conversion (ACE) ou antihypertenseurs
- Les diurétiques
- Les  $\alpha$ -antagonistes adrénergiques
- Les bloqueurs des canaux calciques et potassiques
- Les glucosides cardiaques
- Les hypolipidémiques
- Les vasodilatateurs

## I. Les Inhibiteurs de l'Enzyme de Conversion de l'Angiotensine I (IECA)

Les antihypertenseurs sont destinés à traiter l'hypertension artérielle. Cette maladie a des conséquences délétères majeures par la fréquence de ses complications et le nombre des organes touchés (cerveau, cœur, rein, vaisseaux). La cible biologique de ces médicaments est le système rénine-angiotensine aldostérone. Les inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine I (IECA) inhibent l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ECA) qui participe à la formation de composés vasoconstricteurs comme l'angiotensine II.<sup>2</sup> Ces médicaments permettent aux artéioles de se dilater et ainsi de baisser la tension artérielle. Cette classe d'antihypertenseur est utilisée depuis une vingtaine d'années, elle a très vite conquis le monde médical et constituant un apport thérapeutique majeur dans la prise en charge des maladies cardiovasculaires en particulier l'hypertension artérielle, l'insuffisance cardiaque, le post-infarctus ainsi que dans d'autres indications comme la néphroprotection en particulier chez le diabétique.<sup>3,4,5,6</sup>

---

<sup>1</sup> N. T. Nguyen, R. W. Siegler *Journal of Chromatography A*. **1996**, 735, 123-150.

<sup>2</sup> J. L. Cracowski, P. Boutouyrie in *Chapitre 1 - Inhibiteurs du système rénine-angiotensine, Vol.* (Eds.: S. F. d. P. e. d. Thérapeutique, C. N. d. P. Médicale), Elsevier Masson, Paris, **2016**, pp.3-10.

<sup>3</sup> M. Remko *Chemical Papers*. **2007**, 61, 133-141.

<sup>4</sup> S. H. Kubo, R. J. Cody *Clinical pharmacokinetics*. **1985**, 10, 377-391.

<sup>5</sup> J. C. Song, C. M. White *Clinical pharmacokinetics*. **2002**, 41, 207-224.

<sup>6</sup> J.-P. Ducroix, S. Outurquin, B. Benabes-Jezraoui, V. Gras, G. Chaby, V. Strunski, V. Salle, A. Smail, C. Lok, M. Andréjak *La Revue de médecine interne / fondée par la Société nationale française de médecine interne*. **2004**, 25, 501-506.



Ces médicaments bloquent la synthèse d'Angiotensine II et favorisent la vasodilatation artérielle. Ces derniers agissent sur le système rénine-angiotensine-aldostérone, qui régule la pression sanguine<sup>7</sup>.

### I.A Le système-rénine-angiotensine-aldostérone

Ce système consiste en une suite de réactions enzymatiques, menant à la formation de l'Angiotensine II<sup>8 9</sup>. Le SRA consiste en une cascade d'interactions biochimiques aboutissant à la production d'Ang II, c'est l'un des principaux complexes de régulation de la pression artérielle ainsi que de l'équilibre hydrosodé de l'organisme, principalement par ses effets rénaux. Il participe aussi à la régulation de la vasomotricité et au remodelage tissulaire dans le système cardio-vasculaire<sup>10</sup>.

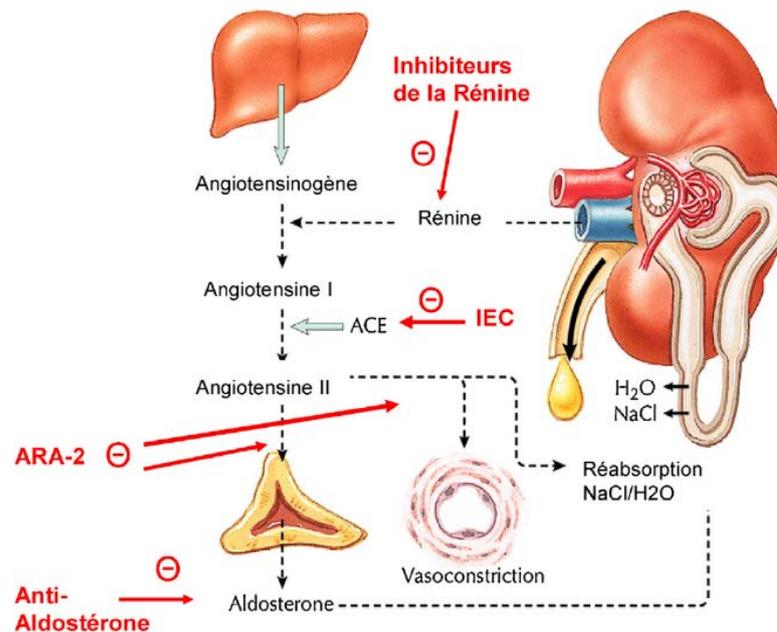


Figure 1. Système rénine-angiotensine et classes thérapeutiques bloquant la cascade enzymatique (Figure reproduite de la référence<sup>11</sup>).

7 G. Sacco, B. Mario, G. Lopez, S. Evangelista, S. Manzini, C. A. Maggi *Vascular Pharmacology*. **2009**, *50*, 166-170.

8 A. Mimran *Revue De Medecine Interne - REV MED INTERNE*. **2007**, *28*.

9 A. J. George, W. G. Thomas, R. D. Hannan *Nature Reviews Cancer*. **2010**, *10*, 745-759.

10 G. Verhoest, T. Dolley-Hitze, F. Jouan, K. Bensalah, Y. Arlot-Bonnemans, F. Dugay, M. A. Belaud-Rotureau, N. Rioux-Leclercq, C. Vigneau *Progrès en Urologie*. **2014**, *24*, 73-79.

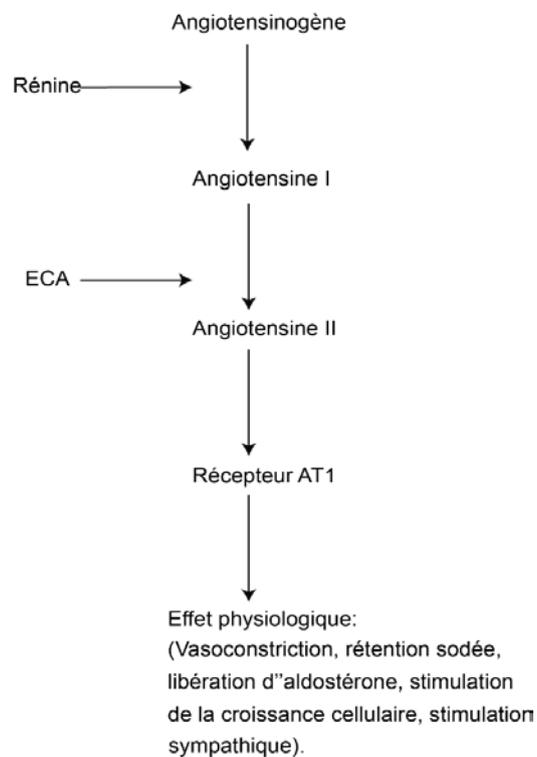
11 C. Zhang, S. Wu, D. Xu *The Journal of Physical Chemistry B*. **2013**, *117*, 6635-6645.



## I.B Angiotensine II

L'Angiotensine II est une hormone peptidique qui a une action hypertensive et un effet vasoconstricteur très puissants. De plus, il est responsable d'une hypertrophie vasculaire et cardiaque, et d'une augmentation de la synthèse et du dépôt de collagène à l'origine d'une fibrose.<sup>2</sup>

La rénine est une protéine synthétisée par le rein via les cellules juxta glomérulaire. Par la suite, la rénine transforme l'angiotensinogène, une protéine fabriquée par le foie, en Ang I, à cette étape l'ECA catalyse la transformation de l'Ang I en Ang II en clivant le dipeptide carboxyl-terminal (His-Leu) (Figure 2).



**Figure 2. Action pharmacodynamique des IECA (Figure reproduite de la référence<sup>15</sup>)**

## I.C L'Enzyme de Conversion de l'Angiotensine I

L'enzyme de conversion de l'angiotensine identique à la kininase II ou carboxypeptidase, est une enzyme importante du système rénine- angiotensine-aldostérone (RAS) qui module les fluides et les électrolytes régulant la pression artérielle en éliminant le dipeptide HIS-Leu de C-terminal. Par la suite l'ACE convertit l'ang I en Ang II et inactive la bradykinine, un peptide



vasodilatateur, par élimination séquentielle de deux dipeptides C-terminaux. Par conséquent, l'ACE est devenu une cible dans le traitement de l'hypertension artérielle, l'insuffisance cardiaque et la néphropathie diabétique<sup>12</sup>.

## II. Les inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine

### II.A Définition

En 1965, Sergio H. Ferreira a prouvé que le venin du serpent *Bothrops jararaca* possède des substances de nature peptidique qui bloque l'ECA<sup>13</sup>. En se basant ainsi sur des relations structure-activité, que Cushman et Ondetti ont synthétisé en 1977 le premier inhibiteur de l'enzyme de conversion, le captopril<sup>14 15</sup>. L'IEC s'est révélée très efficace en tant qu'agent cardioprotecteurs et néphroprotecteurs dans divers essais cliniques, en particulier chez les patients présentant un risque élevé d'événement cardiologiques et de comorbidités, et leur activité pléiotropique peut être observée au-delà du système circulatoire<sup>16</sup>.

Les IECA forment un groupe thérapeutique récent, qui inhibent la conversion de l'angiotensine I en angiotensine II et bloquent le système rénine-angiotensine-aldostérone ce qui permet la diminution de la tension artérielle<sup>10</sup>. Les IECA sont classifiés en trois catégories, en fonction de l'élément structural qui interagit avec l'ECA : fonction sulfohydryl comme le captopril ; de nature carboxylique comme le Trandolapril et de nature phosphoryle comme le fosinopril.

### II.B Mécanisme d'action

D'après la littérature, l'ECA possède trois sites de fixations (S1', S2' et S1) tels que présentés dans la figures ci-dessous : A une extrémité un groupe carbonyle coordnat à un atome de zinc Zn<sup>2+</sup>. A l'autre extrémité un groupe carboxylate se liant à un site acide de l'enzyme, au centre un atome d'oxygène de carboxamide capable d'établir une liaison hydrogène avec l'enzyme<sup>17</sup> Le mécanisme

12 D. M. R. C. Dos Santos, C. B. de Souza, H. J. V. Pereira *Toxicon: Official Journal of the International Society on Toxinology*. **2017**, 131, 63-67.

13 S. H. Ferreira, D. C. Bartelt, L. J. Greene *Biochemistry*. **1970**, 9, 2583-2593.

14 M. A. Ondetti, D. W. Cushman *Journal of Medicinal Chemistry*. **1981**, 24, 355-361.

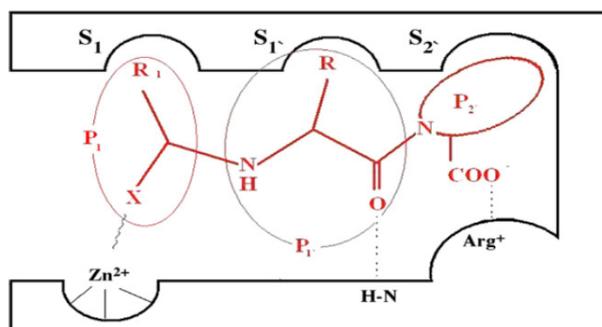
15 P. J. Rudzki, K. Buś, H. Ksycińska, K. Kobylńska *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*. **2007**, 44, 356-367.

16 A. Wzgarda, R. Kleszcz, M. Prokop, K. Regulska, M. Regulski, J. Paluszczak, B. J. Stanisz *European journal of pharmacology*. **2017**, 797, 9-19.

17 M. Bala, M. A. P. Qadar, D. K. Bhardwaj, S. Pasha *Bioorganic & medicinal chemistry*. **2002**, 10, 3685-3691.



d'action des IECA est d'inhiber la biosynthèse de l'angiotensine II, cette activité inhibitrice s'exerce par liaison à l'atome de zinc, avec des affinités variables.



**Figure 3. Schéma d'interaction entre l'angiotensine I et le site actif de l'enzyme de conversion (Figure reproduite de la référence [17](#))**

L'existence de différents conformères de produits pharmaceutiques pouvant affecter leur activité biologique avant et pendant leur métabolisation ; la caractérisation de chaque conformère peut influencer sur la propriété de la molécule sur le processus d'interconversion qui est devenu un enjeu analytique majeur dans l'industrie pharmaceutique. Au cours de ce travail, nous avons choisi le Trandolapril qui possède un groupement carboxylique pour étudier son dynamique d'échange sur l'équilibre conformationnel S-cis / S-trans. Le Trandolapril

Le Trandolapril ou l'acide (2S, 3aR, 7aS)-1-[(2S)-2-[(2S)-1-éthoxy-1-oxo-4-phénylbutan-2-yl] amino propanoyl]-octahydro-1H-indole-2-carboxylique, qui appartient également à la troisième classe des IECA à groupement carboxylique, est une prodrogue qui subit une hydrolyse de la fonction ester pour donner le Trandolaprilate, après une administration par voie orale. Le Trandolapril est un inhibiteur de l'enzyme de conversion de l'angiotensine qui joue un rôle majeur sur la régulation de la pression artérielle<sup>18</sup>. Une analyse de ce médicament commercial en CDCl<sub>3</sub> par résonance magnétique nucléaire (RMN) a montré qu'il possède deux conformères et que l'interconversion entre les deux conformères implique une rotation autour de la liaison amide.<sup>19</sup> La géométrie de chaque conformère a été déterminée par le calcul DFT, avec une différence d'énergie d'environ 6 KJmol<sup>-1</sup> entre le conformère cis (préféré) et trans<sup>19</sup> Dans ce contexte, la spectroscopie par résonance magnétique nucléaire (RMN) s'est avérée être un outil de choix pour l'étude des

<sup>18</sup> D. R. P. Guay *Clinical Therapeutics*. **2003**, 25, 713-775.

<sup>19</sup> S. Li, J. Jin-Liang, Y. Yi-Hua, Y.-B. Wu, S. Xiu-Yan, G. Qian-Qun *Chemical Journal of Chinese Universities -Chinese Edition-*. **2012**, 33, 153-157.

échanges conformationnels. Plusieurs méthodes ont été développées qui permettent d'extraire les paramètres cinétiques et thermodynamiques de l'équilibre conformationnel<sup>20 21 22</sup> Pour le Trandolapril, suite aux conditions physiologiques, la gamme de la température est entre (20°-40°), le régime de l'échange conformationnel est lent, ce qui donne des doublements de proton <sup>1</sup>H et <sup>13</sup>C ont été acquis à 9,4 T et 14.1 T<sup>23</sup>

## II.C Propriétés pharmacocinétiques

Le Trandolapril est administré par voie orale, il provoque une diminution de la concentration d'ang II et une augmentation de l'activité de la rénine, ce qui module donc le système rénine-angiotensine-aldostérone qui joue un rôle majeur sur la régulation de la pression artérielle. Son effet apparaît après 1 heure, avec un pic entre 8 et 12 heures et persiste pendant 24 heures au moins et il est éliminé par voie rénale. Le tableau ci-dessous résume les propriétés physicochimiques de ce produit.

---

20 K. G. Orrell in *Two-Dimensional Methods of Monitoring Exchange*, Vol., John Wiley & Sons, Ltd, **2007**.

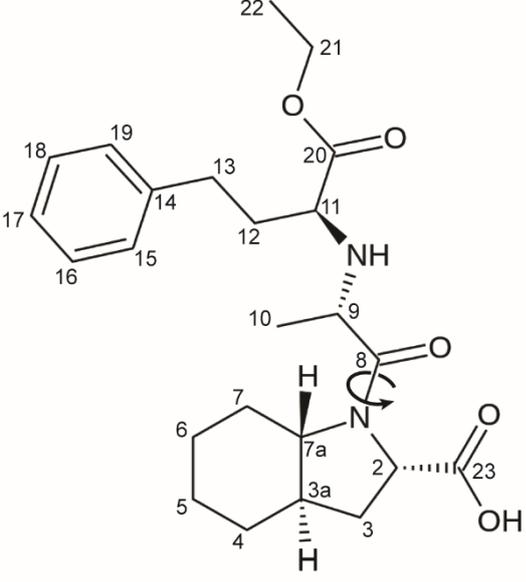
21 C. L. Perrin, T. J. Dwyer *Chemical Reviews*. **1990**, *90*, 935-967.

22 I. R. Kleckner, M. P. Foster *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*. **2011**, *1814*, 942-968.

23 J. J.-L. SHEN Li, YU Yi-Hua, WU Yan-Bo, SUN Xiu-Yan, GU Qian-Qun *Chemical Journal of Chinese Universities*. **2012**, *33*, 153-157.

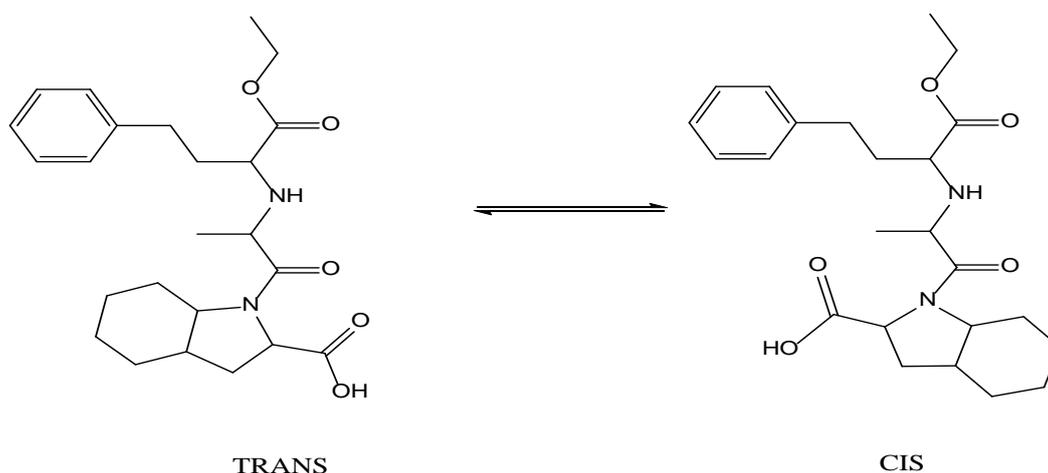


Tableau .1 Les principales caractéristiques physicochimiques et pharmacologiques du Trandolapril

<p><b>Formule semi développée</b></p>	
<p><b>Nom générique international</b></p>	<p>Trandolapril</p>
<p><b>Nom chimique</b></p>	<p>acide (2S, 3aR, 7aS)-1-[(2S)-2-[(2S)-1-éthoxy-1-oxo-4-phénylbutan-2-yl]amino-propanoyl]-octahydro-1H-indole-2-carboxylique</p>
<p><b>Formule brute</b></p>	<p>C<sub>24</sub>H<sub>34</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub></p>
<p><b>Aspect physique</b></p>	<p>Poudre blanche cristalline</p>
<p><b>Solubilité (g/l)</b></p>	<p>Soluble dans le méthanol, chloroforme et dichlorométhane</p>
<p><b>Masse molaire (g/mol)</b></p>	<p>430.53</p>
<p><b>Point de fusion (°)</b></p>	<p>125</p>
<p><b>Médicaments</b></p>	<p>Odrik, Tarka, Mavik,</p>
<p><b>Formulation</b></p>	<p>Comprimé</p>

## II.D Equilibre conformationnel S-cis/S-trans des antihypertenseurs à liaison amide

La présence des groupes R et COOH en position  $\alpha$  et  $\alpha'$  par rapport à la liaison amide privilégie la conformation *s-trans* du Trandolapril au dépend de la conformation *s-cis*.



**Figure 4. Représentation schématique de l'équilibre conformationnel du Trandolapril**

D'après la littérature, des peptides ayant  $n$  liaisons amide contiennent  $2^n$  isomères *s-cis/s-trans* en équilibre conformationnel et qui se transforme à température ambiante (Figure 4)<sup>24-25</sup>. Cet équilibre conformationnel peut être étudié par Résonance Magnétique Nucléaire du  $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$  et par méthodes séparatives telles que la Chromatographie en phase liquide à Haute Performance à polarité de phases inversé (RP-HPLC)<sup>26,27, 28,29 30</sup>. La séparation et l'identification des deux isomères de conformation S-cis/S-trans est basée sur la différence de leur surface

24 R. O. Fox, P. A. Evans, C. M. Dobson *Nature*. **1986**, 320, 192-194.

25 D. F. Mierke, T. Yamazaki, O. E. Said-Nejad, E. R. Felder, M. Goodman *Journal of the American Chemical Society*. **1989**, 111, 6847-6849.

26 W. R. Melander, J. Jacobson, C. Horváth *Journal of Chromatography A*. **1982**, 234, 269-276.

27 A. Kálmán, F. Thunecke, R. Schmidt, P. W. Schiller, C. Horváth *Journal of Chromatography A*. **1996**, 729, 155-171.

28 D. E. Henderson, C. Horváth *Journal of Chromatography A*. **1986**, 368, 203-213.

29 F. Thunecke, A. Kálmán, F. Kálmán, S. Ma, A. S. Rathore, C. Horváth *Journal of Chromatography A*. **1996**, 744, 259-272.

30 J. F. Brandts, H. R. Halvorson, M. Brennan *Biochemistry*. **1975**, 14, 4953-4963.



d'hydrophobicité<sup>31</sup> et de leurs paramètres spectroscopiques (déplacement chimique et constante de couplage <sup>32</sup> <sup>33</sup> . Il ressort de la littérature que les caractères structuraux de cette classe de médicament font appel à des études analytiques spécifiques pour leur détection. Ces composés sont caractérisés particulièrement par de faibles coefficients d'extinction molaire pour les absorptions dans la gamme UV-visible. En conséquence la faible sensibilité des méthodes spectrophotométriques limite leur étude par cette approche.

D'autres méthodes ont été utilisées comme la chromatographie en phase liquide qui est une méthode de séparation des mélanges et notamment des conformères, et constitue une technique commode pour l'analyse des peptides. D'après les études menées par S. Bouabdallah et al.<sup>34</sup> la famille des antihypertenseurs implique l'apparition d'un élargissement et un dédoublement de pics des isomérisations S-cis et S-trans qui tourne autour de la liaison peptidique (Figure 5).

---

31 W. R. Melander, H. J. Lin, J. Jacobson, C. Horvath *The Journal of Physical Chemistry*. **1984**, *88*, 4527-4536.

32 A. Wuttea, G. Gübitz, S. Friebeb, G. J. Krauss *Journal of Chromatography A*. **1994**, *677*, 186-191.

33 S. Bouabdallah, H. Trabelsi, K. Bouzouita, S. Sabbah *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*. **2002**, *54*, 391-405.



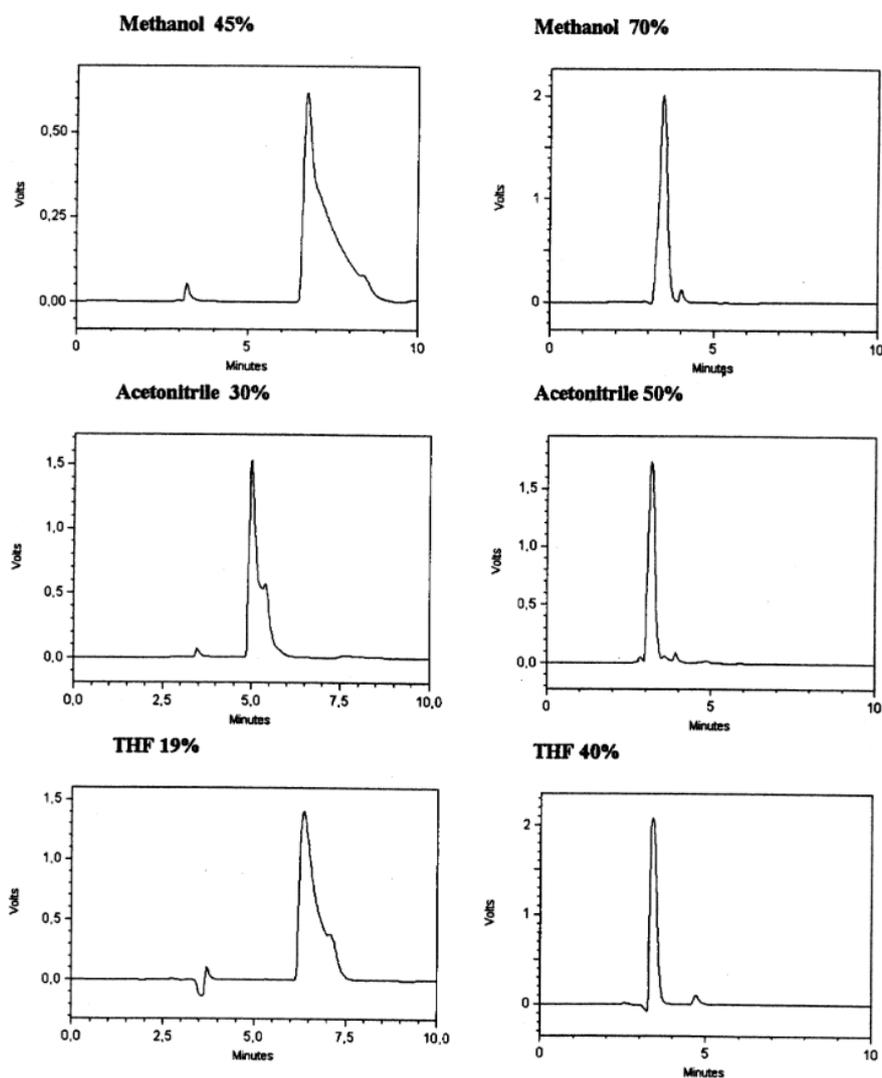


Figure 5. Effet de la nature et la quantité du modificateur organique utilisé sur la séparation des coformères  $s\_cis/S-trans$  du maleate d'énalapril (Figure extraite de la référence<sup>34</sup>).

### III. Rappel : RMN et relaxation

#### III.A Bref historique : du principe de résonance à la spectroscopie de corrélation

Le phénomène de résonance magnétique nucléaire a été observé pour la première fois par Rabi

---

34 S. Bouabdallah, H. Trabelsi, T. Ben Dhia, S. Sabbah, K. Bouzouita, R. Khaddar *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. **2003**, 31, 731-741.



en 1938. Grâce à sa découverte, il a reçu le Prix Nobel de physique en 1944 « pour sa méthode de résonance servant à enregistrer les propriétés magnétiques du noyau atomique ». Quelques années plus tard, en 1945, ce phénomène a été mesuré par deux équipes américaines. Leur découverte a été faite par deux approches légèrement différentes. La première, par l'équipe de Purcell, Torrey et Pound à l'université d'Harvard,<sup>35</sup> par une méthode spectroscopique qui montre l'absorption d'énergie due à la transition entre les niveaux d'énergie Zeeman. La seconde, par l'équipe de Bloch, Hansen et Packard à l'université de Stanford par une méthode magnétique expliquant l'existence d'une induction magnétique nucléaire. Bloch et Purcell ont reçu tous les deux le prix Nobel de physique en 1952 grâce à leurs recherches, « pour la mise au point de nouvelles méthodes de mesure de précision du magnétisme nucléaire et pour les découvertes associées ». Plus tard, la découverte de deux notions fondamentales ; le déplacement chimique et le couplage a ouvert la voie à nombreuses applications en chimie organique et en imagerie<sup>36</sup>. Un autre concept fondamental qui a eu un impact considérable dans le domaine de l'analyse par résonance magnétique nucléaire est la RMN multi-dimensionnelle. Cette approche initialement introduite par Jean Jeener, puis développée avec succès par Richard Ernst, permet de recueillir des informations non pas selon un seul axe de fréquence, mais en corrélant les fréquences de résonance expérimentées par l'aimantation durant deux périodes d'évolution distinctes de l'expérience RMN. On peut ainsi obtenir davantage d'informations sur la molécule qu'avec un simple spectre 1D. Les méthodes 2D COSY, HSQC et HMBC sont parmi les premiers exemples d'expériences permettant de séparer ces informations.

La figure ci-dessous présente une schématisation des corrélations à partir des spectres COSY (s'intéresse aux corrélations H-H par les couplages scalaires J) ; HSQC (s'intéresse aux corrélations H-X à une liaison chimique) et HMBC (s'intéresse aux corrélations H-X à plus d'une liaison chimique).

---

35 E. M. Purcell, H. C. Torrey, R. V. Pound *Physical Review*. **1946**, 69, 37-38.

36 J. Courtieu, N. Giraud, O. Lafon, P. Lesot, C. Lorthioir, J.-M. Nuzillard *ChemInform*. **2013**, 44, no-no.



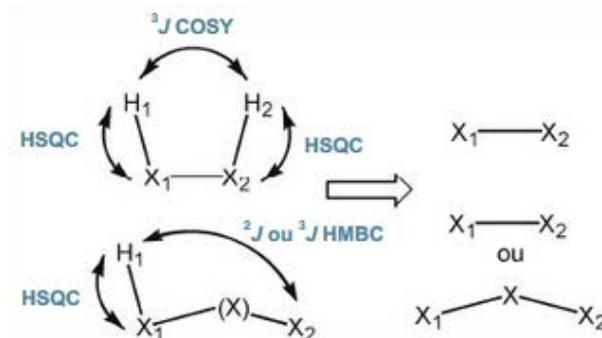


Figure 6. Principe de la création de relations de proximité entre atomes à partir des corrélations de spectres de type COSY et/ou HMBC (Figure extraite de la référence [36](#)).

Dans notre travail, nous nous limiterons à l'étude de la résonance magnétique nucléaire en solution.

### III.B Relaxation nucléaire

La relaxation est l'objet d'études en RMN depuis les années 1945. On distingue deux temps qui caractérisent le processus de relaxation nucléaire ;  $T_1$  pour la relaxation longitudinale et  $T_2$  pour la relaxation transverse. <sup>37-39</sup> Après la phase d'excitation qui correspond au basculement de l'aimantation nucléaire sous l'effet de l'irradiation par un champ radiofréquence, celle-ci retourne à son état d'équilibre par tous les processus susceptibles d'induire les transitions qui permettront au système de spin de restaurer la configuration de spin à l'équilibre. En général, deux conditions doivent être réunies pour que de tels processus soient efficaces : (i) l'existence d'une source de relaxation, c'est à dire d'interactions entre les spins, et/ou entre les spins et le milieu extérieur, dont les fluctuations leur permettront d'agir comme des champs locaux induisant des transitions, et (ii) l'existence d'une source de fluctuations de ces interactions. Très souvent, la dynamique de la molécule étudiée, lorsqu'elle se produit dans une échelle de temps compatible avec les fréquences de Larmor des noyaux qui doivent relaxer, est à l'origine de ces fluctuations. La composante longitudinale de l'aimantation évolue alors avec le temps caractéristique  $T_1$ , tandis que l'évolution de l'aimantation transversale dépend du temps  $T_2$ . Il existe un autre type de processus de relaxation appelé l'effet Overhauser nucléaire (nOe), caractérisé par une vitesse de relaxation

37 D. Canet, Introduction: General Theory of Nuclear Relaxation, **2005**.

38 N. Bloembergen, E. M. Purcell, R. V. Pound *Physical Review*. **1948**, 73, 679-712.

39 D. Canet, Introduction: General Theory of Nuclear Relaxation, **2005**.



croisée notée en principe  $\sigma$ . Ce dernier phénomène, qui correspond en réalité à un mécanisme de relaxation croisée entre les noyaux, se traduit par un transfert de l'aimantation longitudinale entre spins nucléaire sous l'effet de leur couplage dipolaire. On parle d'effet Overhauser nucléaire, s'il y a une modification de l'aimantation du spin S lorsque l'aimantation longitudinale du spin I est hors d'équilibre. Comme le moteur de ce dernier processus est l'interaction dipolaire entre les deux noyaux considérés, cet effet est détectable principalement entre atomes proches dans l'espace, en général moins de 7 Å, mais des transferts relayés peuvent être également observés. L'effet Overhauser nucléaire est par ailleurs très utilisé pour la détermination de la structure en RMN en raison de cette sensibilité à l'agencement spatial local.

## IV. L'échange chimique

Si la résonance magnétique nucléaire est un outil exceptionnel pour étudier la structure et la dynamique interne d'une grande variété de molécules, notamment en biologie, elle apporte également une information avec une résolution atomique sur les processus d'échange chimique. L'échange chimique en RMN désigne l'ensemble des phénomènes par lesquels un noyau dont le signal RMN est mesuré change périodiquement d'environnement au cours de l'expérience RMN, ce qui peut conduire à une perturbation de son spectre. Parmi ces phénomènes, on peut citer les équilibres acido-basiques, les équilibres chimiques en général, mais également les équilibres entre différents conformères d'une même espèce chimique, qui peuvent avoir une influence critique sur son activité biologique, comme c'est le cas dans les peptides par exemple.

### IV.A Echelles de temps et influence sur l'analyse RMN

L'impact du processus d'échange sur le spectre RMN qui est obtenu dépend de la vitesse de ce processus. On peut distinguer plusieurs régimes selon que l'échelle de temps fixée par le processus d'échange va interférer avec les temps de relaxation  $T_1$  et/ou  $T_2$  des noyaux observés, ou l'échelle de temps propre aux interactions (déplacement chimique, couplage scalaire ...) qui sont susceptibles d'être modifiées par l'échange (Figure 7).

#### IV.A.1 Régime d'échange lent

On parle de régime d'échange lent lorsque la vitesse du processus d'échange est suffisamment faible pour le temps de vie de chaque forme de l'équilibre permettant l'acquisition de leurs spectres respectifs. Le cas le plus courant est celui correspondant au dédoublement de la résonance des noyaux subissant l'échange. On observe alors deux pics de résonance distincts (pour un échange entre deux sites A et B) à leurs fréquences caractéristiques  $\delta_A$  et  $\delta_B$ . Le temps de



résidence du proton sur chaque site est alors plus grand que l'inverse de la différence  $\delta_0 = \delta_A - \delta_B$  des fréquences caractéristiques.

#### *IV.A.2 Régime intermédiaire*

Si la vitesse de l'échange augmente et devient du même ordre que  $T_1$  et/ou  $T_2$ , le processus interfère alors avec l'évolution macroscopique de l'aimantation due aux phénomènes de relaxation. Pour une aimantation transverse, la diminution de la durée de vie de chaque état provoque alors un élargissement des raies qui est donné par  $\Delta\nu = k/\pi$ . Dans ce régime intermédiaire, on observe également un rapprochement des signaux correspondant au fait que la durée de vie de chaque état devient trop courte pour que la fréquence de résonance de chaque forme en équilibre puisse être mesurée.

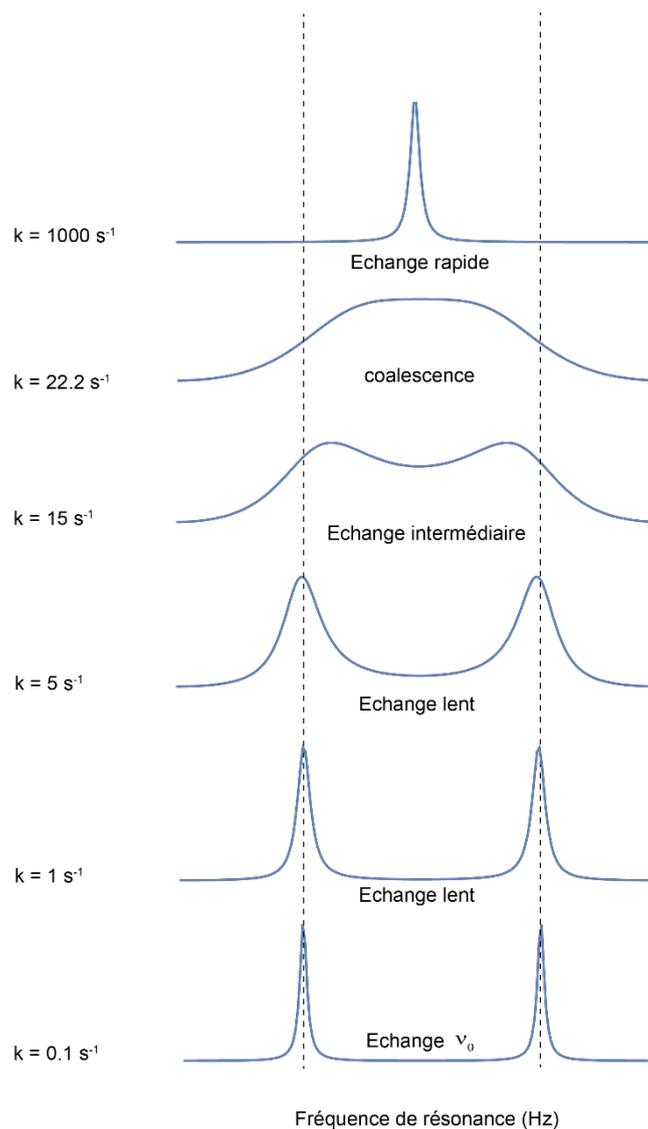
#### *IV.A.3 Coalescence*

La limite du régime intermédiaire est atteinte lorsque les signaux de chaque forme ne peuvent plus être distingués, ce qui correspond à la coalescence. Ce cas limite correspond à la condition  $k = \pi\delta\nu/\sqrt{2}$ , où  $\delta\nu = (\nu_A - \nu_B)$  représente la différence entre les fréquences de résonance des deux états A et B.

#### *IV.A.4 Echange rapide*

Lorsque la vitesse de l'échange devient plus grande, on n'observe qu'une seule résonance à une moyenne pondérée par les populations de chaque forme. Dans le régime d'échange rapide, il y'a d'autre part une contribution à la largeur de la raie moyennée  $\Delta\nu = \pi (\nu_A - \nu_B)^2/2.k$ , qui se traduit par un affinement des raies observées.

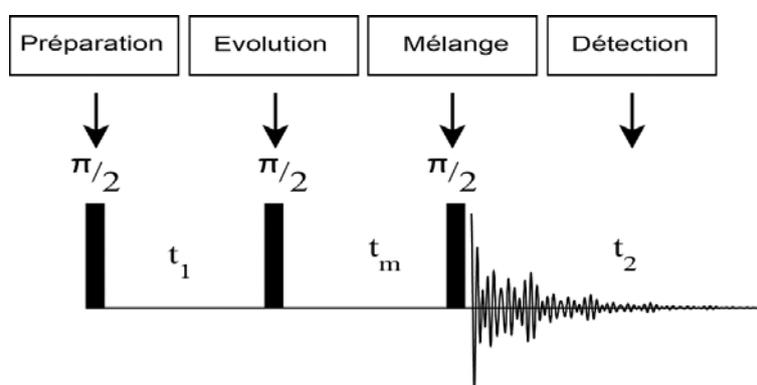




**Figure 7. Spectres simulés d'un spin nucléaire en échange (de bas en haut) nul, lent, intermédiaire, à la coalescence, et en échange rapide. La différence de fréquence de résonance entre les deux sites A et B est de 10 Hz, la constante de vitesse  $k$  est la même dans les deux sens de l'équilibre. Les spectres sont obtenus par transformée de Fourier du signal simulé en intégrant l'équation de Bloch modifiée du système en équilibre, en incorporant une cinétique d'échange, pour un temps d'acquisition de 10 s (le temps de relaxation transverse  $T_2$  de chaque site est de 1 s).**

## IV.B Méthodes expérimentales pour l'analyse de l'échange chimique par RMN

Jeener a introduit une technique générale basée sur le concept de la spectroscopie RMN bidimensionnelle pour analyser ces processus d'échange<sup>38, 39,40</sup>. Historiquement, cette expérience correspond en réalité à l'expérience connue sous l'acronyme NOESY (Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy). La séquence d'impulsion correspondant à cette expérience se décompose en quatre périodes ; temps de préparation, temps d'évolution ( $t_1$ ), temps de mélange  $\tau_m$ , et détection ( $t_2$ ) (Figure 8).



**Figure 8. Séquence d'impulsions de l'expérience NOESY (Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy)**

Durant la période de mélange  $\tau_m$ , l'aimantation longitudinale créée par l'impulsion  $90^\circ$  à la fin du délai d'évolution  $t_1$  évolue sous l'effet de la relaxation longitudinale, de la relaxation croisée (effets nOe), et peut également être affectée par un processus d'échange, avec les effets précédemment décrits.

40 M. D. Arnesen-Trunzo *Open Journal of Social Sciences*. **2015**, 03, 50-56.

41 W. P. Aue, E. Bartholdi, R. R. Ernst *The Journal of Chemical Physics*. **1976**, 64, 2229-2246.

42 J. Jeener, B. Meier, P. Bachmann, R. R. J. Ernst *The Journal of Chemical Physics*. **1979**, 71, 4546-4553.

43 in *Annual Reports on NMR Spectroscopy* | Vol 27, Pages iii-vii, 1-368 (1993) | ScienceDirect.com, Vol. (Ed.^Eds.: Editor), City, **2018**.

44 J. W. Emsley, J. Feeney, L. H. Sutcliffe, *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy*, Elsevier, **2013**.



#### IV.C Etude de l'expérience EXSY

La spectroscopie de résonance magnétique nucléaire des expériences 2D pour l'étude de l'échange conformationnel a été décrite par Jeener, Meir, Bachman et Ernst<sup>21, 40</sup>. Sa base théorique a été élaborée par Macura et Ernst, elle a fait des nombreuses revues<sup>41,42</sup>. Lorsque la vitesse d'échange est comparable à la vitesse de relaxation longitudinale du noyau sondé, la spectroscopie d'échange (EXSY) constitue un moyen pratique d'identifier et d'analyser les résonances de manière résolue en tirant parti de la dispersion des pics de corrélation sur des spectres multidimensionnels. Les expériences EXSY permettent ainsi de sonder les processus physiques dans la fenêtre temporelle à 10-2000 ms<sup>45-49</sup>, la liaison et la libération des ligands<sup>43,44</sup>, l'interconversion topologique de la structure secondaire<sup>45,46</sup> et l'isomérisation<sup>47</sup> cis-trans, qui peuvent tous affecter la vitesse de renouvellement catalytique des enzymes<sup>48,-49 -57-59</sup>

---

45 G. Ivanova, B. Yakimova, S. Angelova, I. Stoineva, V. Enchev *Journal of Molecular Structure*. **2010**, 975, 330-334.

46 A. G. Palmer, C. D. Kroenke, J. Patrick Loria in [10] - *Nuclear Magnetic Resonance Methods for Quantifying Microsecond-to-Millisecond Motions in Biological Macromolecules*, Vol. 339 (Eds.: T. L. James, V. Dötsch, U. Schmitz), Academic Press, **2001**, pp.204-238.

47 A. A. Isab, M. I. M. Wazeer *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. **2006**, 65, 191-195.

48 C. J. Falzone, P. E. Wright, S. J. Benkovic *Biochemistry*. **1994**, 33, 439-442.

49 J. E. H. Pucheta, D. Prim, J. M. Gillet, J. Farjon *ChemPhysChem*. **2016**, 17, 1034-1045.

50 J. Key, T. H. Scheuermann, P. C. Anderson, V. Daggett, K. H. Gardner *Journal of the American Chemical Society*. **2009**, 131, 17647-17654.

51 T. L. Religa, R. Sprangers, L. E. Kay *Science*. **2010**, 328, 98-102.

52 M. Doucleff, G. M. Clore *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **2008**, 105, 13871-13876.

53 J.-P. Demers, A. Mittermaier *Journal of the American Chemical Society*. **2009**, 131, 4355-4367.

54 E. S. Kuloğlu, D. R. McCaslin, J. L. Markley, B. F. Volkman *The Journal of Biological Chemistry*. **2002**, 277, 17863-17870.

55 Y. Nikolaev, K. Pervushin *Journal of the American Chemical Society*. **2007**, 129, 6461-6469.

56 P. Sarkar, C. Reichman, T. Saleh, R. B. Birge, C. G. Kalodimos *Molecular cell*. **2007**, 25, 413-426.

57 D. D. Boehr, H. J. Dyson, P. E. Wright *Chemical Reviews*. **2006**, 106, 3055-3079.

58 J. S. Fraser, M. W. Clarkson, S. C. Degnan, R. Erion, D. Kern, T. Alber *Nature*. **2009**, 462, 669-673.



Expérimentalement, l'évolution de l'aimantation longitudinale durant le temps de mélange  $\tau_m$  d'une séquence EXSY peut être décrite pour un noyau en équilibre entre deux états A et B par l'équation de Bloch modifiée suivante :

$$\frac{d}{dt} \begin{bmatrix} M_z^A \\ M_z^B \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} -\left(\frac{1}{T_1} + k_{AB}\right) & k_{BA} \\ k_{AB} & -\left(\frac{1}{T_1} + k_{BA}\right) \end{bmatrix} \begin{bmatrix} M_z^A - M_z^A(eq) \\ M_z^B - M_z^B(eq) \end{bmatrix} \quad (1)$$

où  $M_z^A$  et  $M_z^B$  correspondent à l'aimantation longitudinale du noyau dans l'état A et B respectivement,  $T_1$  est le temps de relaxation longitudinal (supposé être le même en A et B),  $k_{AB}$  et  $k_{BA}$  sont les vitesses d'échange du processus d'interconversion,  $M_z^A(eq)$  et  $M_z^B(eq)$  correspondent aux aimantation longitudinales à l'équilibre. L'intégration de cette équation différentielle permet de décrire la structure du spectre de corrélation EXSY issu de l'évolution de l'aimantation longitudinale pendant le temps de mélange  $\tau_m$  : deux jeux de corrélations peuvent être mis en évidence, (i) les pics diagonaux correspondant à l'aimantation d'un noyau restant dans l'état A (ou B) durant  $\tau_m$ , et (ii) des pics de corrélation matérialisant l'aimantation d'un noyau qui s'est échangé entre les états A et B pendant  $\tau_m$ . La résolution de l'équation (1) sera discutée dans la suite pour exploiter les expériences EXSY présentées, et en extraire les paramètres dynamiques de l'échange du Trandolapril.

Un nombre très important d'études de processus d'échanges chimiques par RMN a été rapportée dans la littérature au cours des dernières décennies<sup>59-61</sup>. Des spectres EXSY ont été également enregistrés sur le Trandolapril <sup>19</sup>. Cependant, un problème que l'on rencontre souvent dans cette approche est la résolution spectrale qui peut être obtenue. En effet, les deux formes qui sont en échange constituent deux systèmes de spin différents et le spectre résultant est la somme de deux ensembles de signaux différents qui se superposent au moins partiellement. Dans les parties suivantes, le principe des différentes méthodes qui ont été mises en œuvre au cours de cette thèse pour améliorer la résolution des spectres EXSY est présenté, et les principales expériences sont introduites.

## V. Expériences RMN avec encodage spatial.

### V.A Impulsions polychromatiques, « sélectives », et encodées spatialement

L'encodage spatial repose sur l'application simultanée d'impulsions sélectives et d'une impulsion



de gradient de champ magnétique. Dans une expérience de RMN dite impulsionnelle, des impulsions radiofréquences de courtes durées<sup>50</sup>, de l'ordre d'une dizaine de microsecondes, sont employées. La gamme de fréquences ainsi, couverte par ces impulsions est de l'ordre de la centaine de kHz : tous noyaux dont la fréquence de résonance se situe dans cette gamme verront leurs spins excités. On parle d'impulsions polychromatiques ou « hard-pulses ». Dans le cas d'une analyse proton sur un spectromètre opérant à 600 MHz, une impulsion rectangulaire de 90° d'une durée de 10µs pour une puissance donnée excitera des protons sur une gamme de 25 kHz, soit 42 ppm, ce qui est largement suffisant pour exciter de manière homogène les protons de la plupart des molécules organiques diamagnétiques.

Pour obtenir des impulsions sélectives, le principe consiste à rallonger la durée de l'impulsion pour qu'elle affecte une gamme spectrale réduite. En diminuant la puissance de l'impulsion, il devient alors nécessaire d'augmenter sa durée afin de conserver l'angle de basculement d'aimantation désiré. La conséquence directe de l'augmentation de la durée d'impulsion est la diminution de la gamme de fréquences excitées<sup>51 52</sup>. Ainsi, une impulsion sélective d'une centaine de millisecondes correspondra à une gamme de fréquences d'une dizaine d'hertz. Il est alors possible de ne sélectionner qu'un seul signal sur le spectre pour lequel les interactions RMN seront observables. Ces impulsions de plus longue durée sont qualifiées de sélectives. Elles sont caractérisées par plusieurs paramètres interdépendants. Ces derniers sont choisis et calibrés en fonction des échantillons et des spectromètres, en effectuant plusieurs analyses :

- La forme de la modulation d'amplitude de l'impulsion définit son profil d'excitation ou d'inversion. Il en existe un grand nombre: Gauss, Burp, Sinc, SNOB, SNEEZE, etc.<sup>63</sup>
- La durée de l'impulsion détermine la gamme de fréquences excitée et donc la sélectivité spectrale. Plus une durée d'impulsion est longue, plus la gamme de fréquences excitées est

---

59 F. Kateb, P. Pelupessy, G. Bodenhausen *Journal of Magnetic Resonance*. **2007**, 184, 108-113.

60 E. Canet, D. Mammoli, P. Kadeřávek, P. Pelupessy, G. Bodenhausen *Physical Chemistry Chemical Physics*. **2016**, 18, 10144-10151.

61 E. Canet, F. Kateb, T. Segawa, A. Sehgal, G. Bodenhausen, P. Pelupessy *L'Actualité chimique*. **2017**, 416, 19.

62 H. Geen, R. Freeman *Journal of Magnetic Resonance (1969)*. **1991**, 93, 93-141.

63 R. Freeman *Journal of Molecular Structure*. **1992**, 266, 39-51.



réduite et plus la sélectivité est grande. Ce paramètre est à choisir en fonction de la longueur spectrale des signaux de la molécule et l'espacement des signaux entre eux. Il est à noter que pour une même sélectivité, la durée d'une impulsion à employer dépend de la forme de la modulation d'amplitude choisie. Ainsi, pour une sélectivité de 55 Hz, une impulsion E-EBURP2 nécessite une durée de 90 millisecondes quand une impulsion E-Snob n'en nécessite que 30 (d'après la littérature).

- La puissance est calibrée pour chaque type d'impulsion afin d'obtenir l'angle pour lequel elle est développée: 90° ou 270° en excitation et 180° en refocalisation

L'encodage spatial est réalisé en utilisant ces impulsions sélectives simultanément à un gradient pulsé de champ magnétique. Contrairement à l'impulsion sélective qui excite tous les noyaux de l'échantillon à une fréquence de résonance donnée, l'utilisation d'un gradient de champ pulsé permet à l'impulsion sélective de créer ou de modifier des cohérences de spin sélectivement, dans des zones différentes de l'échantillon.

## V.B Gradient de champ magnétique

Lors d'une expérience RMN, l'emploi d'une impulsion de gradient de champ magnétique provoque une « perturbation » volontaire et contrôlée du champ magnétique  $B_0$ . Ces impulsions sont produites par des bobines situées dans les sondes. Dans le cas d'un gradient Z, celui-ci sera produit par des bobines axées sur l'axe Z. Avec la sonde adéquate, il est également possible de produire des gradients le long des axes X et Y. A l'instar des impulsions radiofréquences, les impulsions de gradients sont caractérisées<sup>53</sup> par leur puissance, leur forme, leur durée et l'axe selon lequel elles sont appliquées. Ainsi par l'application d'un gradient G (en gauss.cm<sup>-1</sup>) suivant l'axe Z, la fréquence de résonance  $\nu$  d'un même type de noyau devient une fonction linéaire de Z telle que:  $\nu(Z)=(\gamma/2\pi)(B_0+G_Z \cdot Z)$  (le déplacement chimique est négligé dans cette expression).

Dans les séquences d'impulsions, les impulsions de gradient de champ magnétique sont placées dans les séquences d'impulsions afin de sélectionner les chemins de cohérences dont on souhaite détecter le signal observable en déphasant puis en rephasant les cohérences souhaitées. Il est ainsi possible de s'affranchir du cyclage de phases au prix d'une perte de sensibilité liée au déphasage d'une partie de signal. En revanche, lorsqu'un gradient, en général de faible puissance, est appliqué simultanément à une impulsion radiofréquence sélective, la fréquence du ou des

---

53 B. Plainchont, D. Pitoux, G. Hamdoun, J.-M. Ouyard, D. Merlet, J. Farjon, N. Giraud *Physical Chemistry Chemical Physics*. **2016**, *18*, 31338-31338.



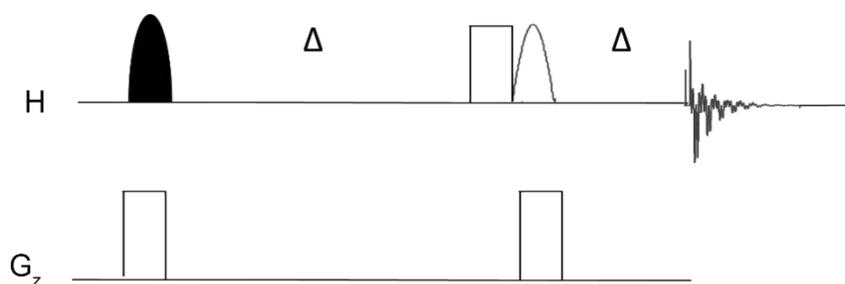
spins sélectivement excités (ou refocalisés) devient dépendante de la position de la région encodée dans l'échantillon: On parle alors d'encodage spatial <sup>64</sup>. Dans le cas d'un encodage suivant l'axe Z, l'échantillon va être «découpé en tranches» dont l'épaisseur dépendra de la sélectivité de l'impulsion sélective. Chacune de ces tranches génère un signal résonant à la fréquence correspondante. Le spectre total obtenu sera la somme des signaux des tranches.

### V.C La méthode Zangger-Sterk (ZS)

La méthode Zangger-Sterk désigne l'ensemble des séquences d'impulsion basées sur l'utilisation d'impulsions sélectives spatialement encodées par un gradient de champ magnétique pour produire des spectres de haute résolution. Sous l'influence du gradient de champ, la fréquence de résonance des spins dépend de leur position dans l'échantillon. Cette méthode basée sur un encodage spatial qui s'appelle aussi méthode ZS, permet de manipuler séparément les protons de la molécule, pour refocaliser, laisser évoluer ou réintroduire les différentes interactions de spin (déplacements chimiques, couplages scalaires ...).

## VI. Principe de la RMN « pure shift »

Les expériences « pure shift » permettent l'obtention de spectres proton qui présentent uniquement des singulets aux déplacements chimiques de chaque site proton. Historiquement, les premiers spectres RMN <sup>1</sup>H « pure shift » ont été obtenus en projetant sur sa dimension directe une carte 2D J-résolue.<sup>5455</sup> En 1997, ce sont cependant Zangger et Sterk qui ont ouvert une nouvelle voie de développements méthodologiques en proposant une approche basée sur l'encodage spatial introduit ci-dessous (Figure 9).



**Figure 9. Séquence d'impulsions de découplage homonucléaire proposée par Zangger et Sterk en 1997. Les impulsions sélectives 90° d'excitation et de refocalisation de 180° sont respectivement représentées**

54 A. J. Pell, J. Keeler *J Magn Reson.* **2007**, 189, 293-299.

55 W. P. Aue, J. Karhan, R. R. Ernst *The Journal of Chemical Physics.* **1976**, 64, 4226-4227.



par des formes noires et blanches. Les impulsions polychromatiques de  $180^\circ$  sont représentées par des rectangles blancs sur le canal proton. Les impulsions gradient d'encodage sont représentées par des rectangles blancs sur le canal gradient Z.

Cette séquence de découplage homonucléaire est d'abord composée d'une impulsion à  $90^\circ$  sélective encodée spatialement excitant tous les protons ensuite suivie de deux impulsions à  $180^\circ$ . La première impulsion étant polychromatique et la deuxième étant spatialement encodées. Deux impulsions de refocalisations s'incrémentant au fur et à mesure des expériences en deux délais identiques. Le principe de cette séquence est de laisser le déplacement chimique évoluer et de refocaliser les couplages pendant le délai  $\Delta$ . Cette expérience est très intéressante, car elle peut être acquise sous la forme d'une expérience 2D ( $\Delta$  devient alors le délai d'évolution indirect) pour obtenir des cartes avec des signaux proton découplés le long de la dimension indirecte. Plusieurs approches ont été développées pour développer des blocs d'évolution générant un découplage homonucléaire, comme les méthodes BIRD, PSYCHE et donc ZS.

#### VI.A Méthode Zangger-Sterk pour l'acquisition de spectres « pure shift »

L'expérience Zanger-sterk (ZS « pure shift »)<sup>56</sup> est une analyse pseudo 2D utilisant une séquence d'impulsions relativement similaire à celle de l'expérience  $\delta$ -resolved (Figure 10).

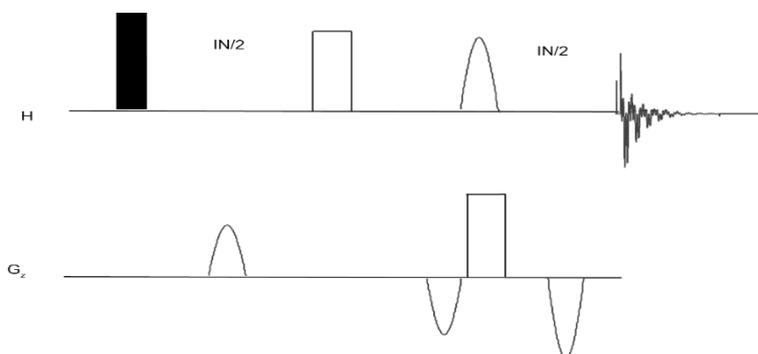


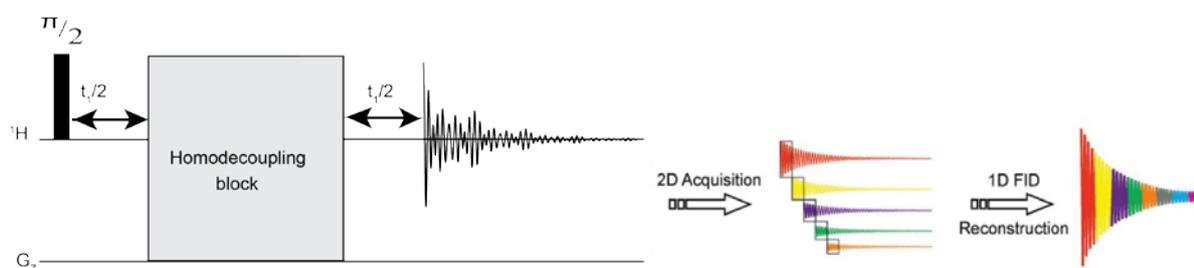
Figure 10. Séquence d'impulsions de l'expérience ZS « pure shift ». Les impulsions de refocalisation de  $180^\circ$  sont représentées par des formes noires et blanches sur le canal du proton. Les impulsions polychromatiques de  $90^\circ$  et de  $180^\circ$  sont respectivement représentées par des rectangles noirs et blancs

<sup>56</sup> K. Zangger, H. Sterk *Journal of Magnetic Resonance*. **1997**, 124, 486-489.



sur le canal proton. Les impulsions gradient d'encodages et celle de nettoyage sont respectivement représentées par des rectangles blancs et des formes blanches sur le canal gradient Z.

Cette séquence est utilisée pour reconstruire un signal 1D « pure shift » obtenu à partir de séries de points enregistrés pour des valeurs incrémentées du délai IN. Cette dernière approche, appelée approche interférométrique, est à la base de la plupart des méthodes récentes d'acquisition indirecte de spectres RMN « pure shift ». Cependant, pour obtenir un spectre 1D homodécouplé, un retraitement des données particulier est nécessaire, comme illustré en Figure 15. A partir de l'analyse pseudo 2D constituée de TD<sub>1</sub> expériences, s'incrémentant d'une durée IN et avec un temps d'échantillonnage DW, un FID d'une analyse 1D proton sera reconstitué. Il comptera TD<sub>1</sub> portions (ou chunks) de FID d'une durée IN et IN/DW points. La transformée de Fourier de ce FID ainsi reconstitué génère un spectre « pure shift ». Cela n'est pas valable que si la durée IN est suffisamment courte pour que le couplage scalaire entre les spins n'ait pas du temps d'évoluer.



**Figure 11. FID représentation schématique de la reconstruction d'un FID « pure shift » dans une méthode interférométrique extraite de la référence <sup>57</sup>**

## VI.B Méthode PSYCHE

Les expériences basées sur la méthode PSYCHE permettent également l'obtention des spectres 1D avec découplage homonucléaire de façon similaire à la ZS « pure shift » <sup>58</sup>. Ces expériences sont aussi basées sur la mise en œuvre d'un bloc d'écho de spin, au milieu duquel sont implémentés des impulsions de type Chirp <sup>59</sup>. En effet, le bloc PSYCHE n'utilise pas des impulsions sélectives spatialement encodées : il a recours à l'application simultanée d'impulsions

<sup>57</sup> K. Zangger *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy*. **2015**, 86-87, 1-20.

<sup>58</sup> M. Foroozandeh, R. W. Adams, N. J. Meharry, D. Jeannerat, M. Nilsson, G. A. Morris *Angewandte Chemie International Edition*. **2014**, 53, 6990-6992.

<sup>59</sup> M. Foroozandeh, R. W. Adams, N. J. Meharry, D. Jeannerat, M. Nilsson, G. A. Morris *Angewandte Chemie International Edition*. **2014**, 53, 6990-6992.



adiabatiques et d'une impulsion de gradient de champ magnétique : une notion de sélectivité spatiale est donc également présente dans cette séquence, mais elle sert à éliminer certains artefacts générés par l'impulsion Chirp en les déphasant à travers l'échantillon. Contrairement aux impulsions radiofréquences classiques qui existent simultanément tous les spins, ces impulsions adiabatiques effectuent un balayage d'une gamme de fréquence donnée. Ainsi des spins ayant des fréquences de résonance différentes seront excités à des moments différents durant l'impulsion. L'idée sous-jacente consiste à agir sur une partie d'une population de spin sélectionnée statistiquement pour qu'elle soit découplée des autres.

Ce type d'impulsions présente l'avantage d'être moins sensible aux mauvaises calibrations radiofréquences et a donc une plus grande tolérance aux inhomogénéités spatiales du champ. La séquence PSYCHE est représentée dans la figure, utilise deux impulsions adiabatiques symétriques de type «Smoothedchirp» avec un angle de basculement  $\beta$  réduit qui est inférieure à  $45^\circ$ . Ce bloc a pour effet de refocaliser les couplages scalaires tout en laissant évoluer le déplacement chimique. L'analyse PSYCHE emploie le même traitement que l'expérience ZS « pure shift » pour reconstruire un FID et obtenir après un transformé de fourrier un spectre « pure shift ».

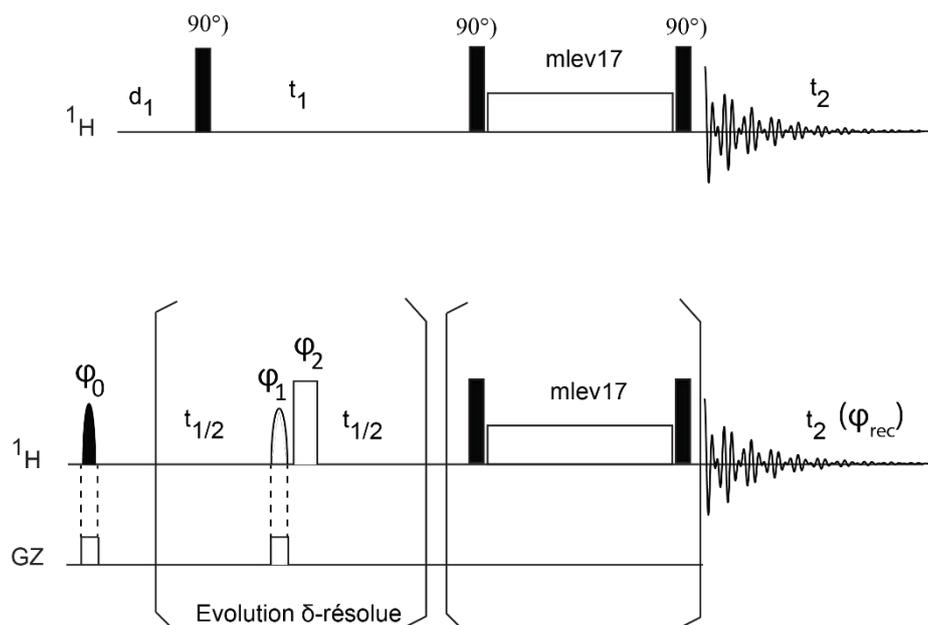
## VI.C Application de la méthode « pure shift » à l'expérience TOCSY

Outre l'obtention de spectres 1D, le bloc de découplage homonucléaire peut être mis à profit dans des expériences 2D. Ainsi dès le développement de ce bloc, son utilisation possible dans la séquence d'impulsions TOCSY a été démontrée.<sup>67,60</sup> En le plaçant au milieu du temps d'évolution  $t_1$ , le spectre 2D présentera des taches de corrélations sans multiplicité dans la dimension indirecte (Figure 12).

---

<sup>60</sup> D. Pitoux, Z. Hu, B. Plainchont, D. Merlet, J. Farjon, D. Bonnaffé, N. Giraud *Magnetic Resonance in Chemistry*. **2015**, 53, 836-844.





**Figure 12. (Haut) Séquence d'impulsions TOCSY (Total Correlation Spectroscopy) et (bas) Séquence d'impulsion  $\delta$ -resolved TOCSY avec bloc MLEV 17.**

La lecture des cartes de corrélation s'en retrouve alors simplifiée, comme le démontrent les données acquises sur le Trandolapril présentées dans la suite de ce manuscrit.

## VII. L'échantillonnage non uniforme du signal

Aux débuts de la spectroscopie RMN, des longues périodes de mesure étaient nécessaires afin d'obtenir le rapport signal/ bruit souhaité. Cela s'est rapidement amélioré avec l'arrivée des aimants à haut champ, des sondes cryogéniques, des techniques améliorées de marquage d'isotopes et de nouvelles séquences d'impulsions. Les expériences multidimensionnelles ne sont plus aussi « limitées en sensibilité » que « limitées en échantillonnages », car de longues périodes expérimentales sont nécessaire pour échantillonner systématiquement tous les points de la grille de Nyquist.

L'acquisition d'expériences à  $n$ -dimensions ( $n \geq 2$ ) implique l'échantillonnage en  $t^{n-1}$  dimensions indirectes. L'idée initiale de se débarrasser de certains points des dimensions a été proposée en 1987 par Barna<sup>61</sup> et Al. L'idée était d'avoir une plus haute « Densité » de points d'échantillonnage au début d'un FID ; où le rapport signal sur bruit est plus élevé et où il y a moins

<sup>61</sup> J. C. J. Barna, E. D. Laue, M. R. Mayger, J. Skilling, S. J. P. Worrall *Journal of Magnetic Resonance* (1969). **1987**, 73, 69-77.



de points d'échantillonnage à un rapport signal sur bruit inférieur. Le signal correspondant ensuite a été reconstruit en utilisant les algorithmes de reconstruction Maximum Entropy<sup>62</sup> & Clean<sup>63</sup>. Cette approche est appelée échantillonnage non uniforme (Non Uniform Sampling – NUS). Comme mentionné précédemment, le spectre dans le domaine des fréquences  $S$  est lié au signal FID « $s$ » dans le domaine temporel par la transformée de Fourier. La relation entre le signal dans le domaine temporel est celui dans le domaine fréquentiel peut donc être donnée par :

$$FS = s \quad (2)$$

où  $F$  est la transformée de Fourier discrète inverse (DFT). Dans le cas d'un échantillonnage conventionnel, le nombre de points dans  $S$  et  $s$  sont les mêmes et le système d'équations (1) est unique. Dans le cas d'un échantillonnage de type NUS, on ne peut prélever qu'une fraction de points de  $s$  de la grille de Nyquist et on doit extrapoler les informations du spectre  $S$ . Cependant, cela rend le système d'équation (1) sous-déterminé, et le problème doit donc être résolu avec des méthodes de traitement de signaux autres que Fourier. Pour reconstruire  $S$  correctement, il est nécessaire de faire certaines hypothèses sur les caractéristiques de la solution souhaitée<sup>64</sup>. La précision et les artefacts du spectre reconstruit dépendent fortement du schéma d'échantillonnage et de l'algorithme de reconstruction utilisé.<sup>74</sup> La nature de ces artefacts peut être comprise en utilisant le concept de fonction d'étalement du point. La fonction d'étalement du point (PSF) est la DFT de l'échantillonnage vecteur ou les points de données échantillonnés sont définis sur « 1 » et ceux omis sont réglés sur « 0 ». La DFT de données non uniformément échantillonnées sera une convolution de la DFT d'une donnée échantillonnée uniformément avec la fonction d'étalement de point réduite à zéro points. Le vecteur de signal est équivalent à choisir la solution avec une puissance minimale de  $l_2$  (théorème de Parseval). De plus l'amplitude des artefacts est proportionnelle à l'intensité du composant dans le signal. Cela implique que les artefacts d'échantillonnage ne sont pas aléatoires et peuvent être déterminés.

De nombreux algorithmes de reconstruction pour NUS ont été proposés dans la littérature au cours des années pour résoudre l'équation (1) : (quand  $S > s$ ). Chacun de ces algorithmes utilise différents types d'hypothèses, par exemple, la connaissance des régions vides dans un spectre<sup>65</sup>,

---

62 S. Sibisi, J. Skilling, R. G. Brereton, E. D. Laue, J. Staunton *Nature*. **1984**, 311, 446-447.

63 J. C. J. Barna, S. M. Tan, E. D. Lade *Journal of Magnetic Resonance* (1969). **1988**, 78, 327-332.

64 K. Kazimierczuk, V. Orekhov *Magnetic Resonance in Chemistry*. **2015**, 53, 921-926.

65 Y. Matsuki, M. T. Eddy, J. Herzfeld *Journal of the American Chemical Society*. **2009**, 131, 4648-4656.



l'entropie maximale de S, la densité maximale (CS)<sup>6667</sup> ou la décomposition multidimensionnelle (MDD)<sup>68 6970</sup>. Rovnyak et al<sup>71</sup> ont montré avec succès comment des périodes d'échantillonnage NUS sont soigneusement choisis afin d'avoir un gain de sensibilité significatif. La plupart de ces procédures sont très coûteuses en temps de calcul et nécessitent généralement l'ajustement de certains paramètres.

Par conséquent, la méthode NUS est une technique extrêmement puissante pour réduire le temps d'acquisition sans aucune perte de résolution spectrale et de gain de sensibilité. Plus important encore, NUS est maintenant implémenté dans les séquences d'impulsions existantes par tous les fournisseurs de spectromètres. Dans la suite, des résultats mettant en œuvre un échantillonnage non uniforme seront présentés pour évaluer son impact sur la qualité des spectres « pure shift » acquis avec découplage homonucléaire sur le Trandolapril.

## VIII. Introduction du sujet

Dans notre travail, nous avons développé de nouvelles expériences de corrélations basées sur un encodage spatial en fréquence dans le but d'améliorer la qualité de l'analyse de l'échange conformationnel dans un composé à portée thérapeutique « le Trandolapril ». Nous évaluons d'abord la robustesse des paramètres d'acquisition de découplage homonucléaire choisi par l'interférogramme, dans le cas particulier d'un échantillon soumis à un échange chimique. Nous rapportons la mise en œuvre d'une légère évolution de la séquence d'impulsions introduite par Thiele et al. dans lequel nous avons utilisé la méthode PSYCHE pour effectuer un découplage homonucléaire. Nous avons comparé les spectres EXSY obtenus avec les cartes 2D standard et nous avons évalué la qualité des paramètres cinétiques et thermodynamiques qui sont extraits de l'analyse des corrélations mesurées sur des ensembles de données EXSY « pure shift ».

Le chapitre suivant est consacré à l'optimisation préliminaire étudiée sur les différentes méthodes « pure shift », l'étude de la dynamique d'échange du Trandolapril qui se situe dans un régime accessible par cette approche, la comparaison entre l'approche classique et « pure shift

66 D. J. Holland, M. J. Bostock, L. F. Gladden, D. Nietlispach *Angewandte Chemie International Edition*. **2011**, *50*, 6548-6551.

67 K. Kazimierczuk, V. Y. Orekhov *Angewandte Chemie International Edition*. **2011**, *50*, 5556-5559.

68 S. Hiller, I. Ibraghimov, G. Wagner, V. Y. Orekhov *Journal of the American Chemical Society*. **2009**, *131*, 12970-12978.

69 V. Y. Orekhov, V. A. Jaravine *Prog Nucl Magn Reson Spectrosc*. **2011**, *59*, 271-292.

70 V. Tugarinov, L. E. Kay, I. Ibraghimov, V. Y. Orekhov *Journal of the American Chemical Society*. **2005**, *127*, 2767-2775.

71 D. Rovnyak, M. Sarcone, Z. Jiang *Magnetic Resonance in Chemistry*. **2011**, *49*, 483-491.



».1D et l'analyse des résultats des expériences 2D classique par la mise au point d'un protocole d'analyse de la qualité des données spécifiques.

Le troisième chapitre est destiné à la présentation des développements méthodologiques à travers la description de la nouvelle expérience de corrélation, l'expérience 2D EXSY-PSYCHE (Exchange Spectroscopy- « pure shift » Yielded by CHirp Excitation), ZS (Zangger-Sterk) et Nus (Non Uniform Samplig).pour améliorer de manière significative la résolution des spectres de corrélation EXSY et en extraire des paramètres cinétiques et thermodynamiques de l'équilibre conformationnel. Ces résultats sont validés par des calculs de niveau DFT, suivi d'une étude de l'attribution du Trandolapril.



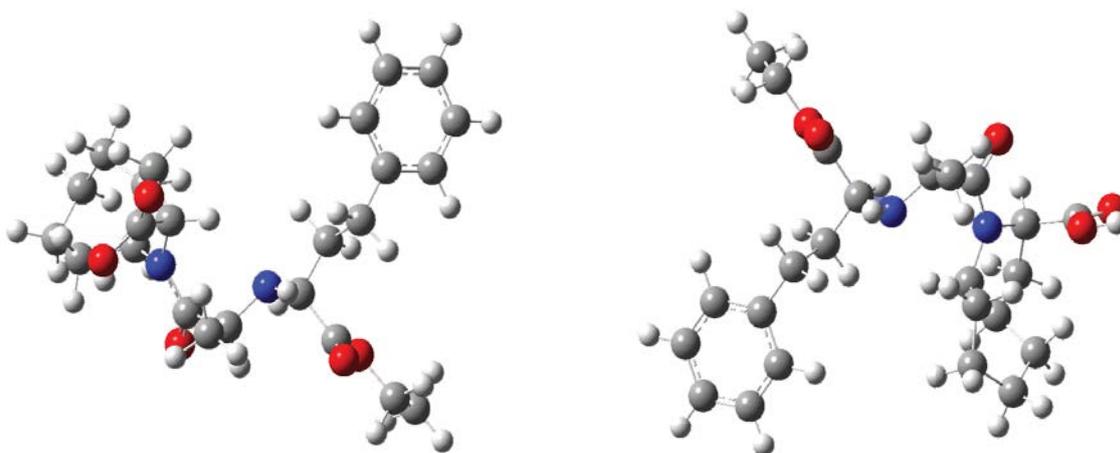
---

## **CHAPITRE II. ETUDE PRELIMINAIRE DU TRANDOLAPRIL**

---

## I. Spectroscopie RMN 1D : influence de l'échange conformationnel

Il a été démontré que le Trandolapril dissout dans le chloroforme existe sous forme d'un équilibre entre deux conformères dont les structures ont été proposées au moyen d'une optimisation par un calcul de type DFT (Figure 13)<sup>19</sup>. Dans cette section, nous présentons les spectres préliminaires que nous avons acquis pour caractériser l'échantillon de Trandolapril que nous avons choisi de dissoudre dans le méthanol-d<sub>4</sub>, (i) pour déterminer s'il est également le siège d'un échange conformationnel, et (ii) effectuer l'attribution des spectres RMN <sup>1</sup>H et <sup>13</sup>C. En conséquence, une analyse poussée des différents spectres RMN du Trandolapril a été entreprise afin de confirmer l'existence des deux conformères S-cis/S-trans.



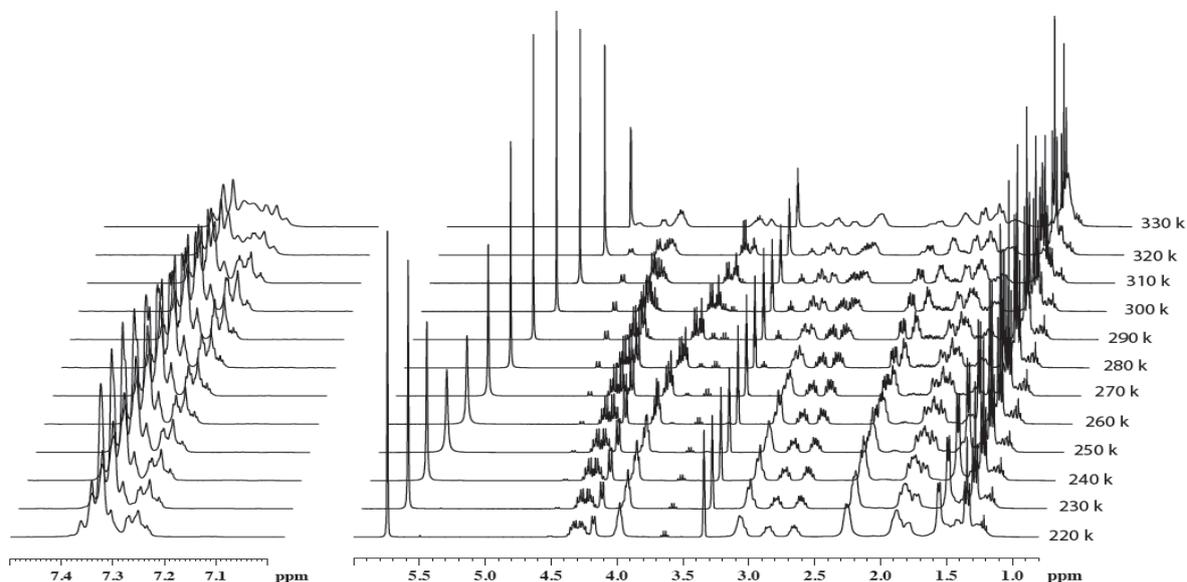
**Figure 13.** La géométrie optimisée par calculs de type DFT des deux conformères identifiés.

Dans la suite, toutes les expériences ont été effectuées sur 15 mg de Trandolapril dissous dans 600  $\mu$ L de méthanol deutéré. Les spectres ont été acquis sur un spectromètre RMN Bruker AVANCE II fonctionnant à 14,1 T (600 MHz en proton), équipé d'une crysonde de 5 mm <sup>2</sup>H / <sup>1</sup>H avec une bobine à gradient de champ z.

Nous avons enregistré une série de spectres RMN 1D <sup>1</sup>H sur l'échantillon de Trandolapril, en faisant varier la température entre 220 et 330 K. Les spectres que nous avons obtenus sont représentés en Figure 14. Sur ces spectres nous observons plusieurs modifications des signaux qui suggèrent la présence d'un échange conformationnel. En particulier, nous voyons, pour les températures les plus élevés, des signaux dont le déplacement chimique varie avec la température, ce qui suggère que pour cet échantillon, la plage de température à laquelle notre sonde



RMN permet de travailler correspond à un régime d'échange lent à intermédiaire. Cette information est importante, puisqu'elle ouvre la voie à une étude de l'échange lent par spectroscopie 2D EXSY. En revanche, le grand nombre de signaux limite la résolution de ces données.



**Figure 14. Etude de la température du Trandolapril entre 220-330K à 9.4T**

Ces résultats nous ont incités à (i) effectuer une série d'analyses 2D pour attribuer le plus possible de résonances du Trandolapril, et notamment identifier le système de spins de chaque conformère, et (ii) à évaluer la possibilité d'appliquer une méthode « pure shift » sur cet échantillon lorsqu'il est en régime d'échange lent ou intermédiaire.

## II. Spectroscopie de corrélation 2D

Nous avons dans un premier temps acquis des spectres 2D de corrélation homo- et hétéronucléaire, mettant en œuvre des expériences classiques de type COSY (Figure 15) et HSQC (Figure 16). Les nombres de points acquis dans chaque dimension de ces cartes 2D étaient supérieurs aux valeurs qui peuvent être enregistrées en routine pour optimiser la résolution de ces données, ce qui peut facilement être constaté dans les figures 15 et 16 où la multiplicité des corrélations est visible dans chaque dimension, reflétant une résolution élevée, de l'ordre du Hertz.

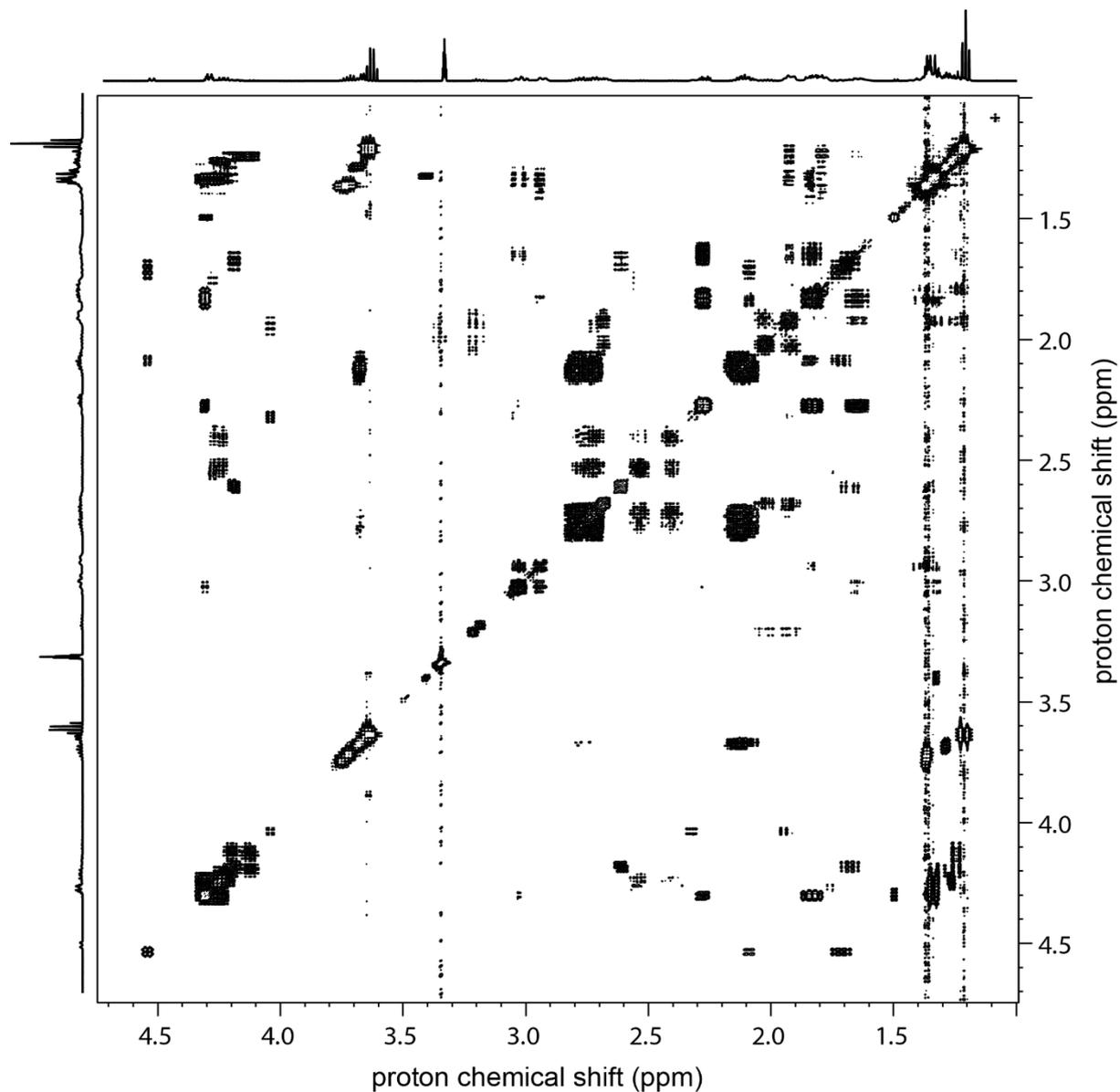


Figure 15. Spectre RMN 2D  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY enregistré sur 15 mg de Trandolapril dans MeOD à 14.1 T (T = 300 K).

Cependant, en dépit de cette haute qualité de données, plusieurs régions de ces spectres montrent de fortes superpositions de signaux, ce qui pouvait être attendu pour une molécule de cette taille, et est aggravé par le fait que deux systèmes de spins sont présents dans l'échantillon, et donc deux spectres légèrement différents se superposent dans ces données.

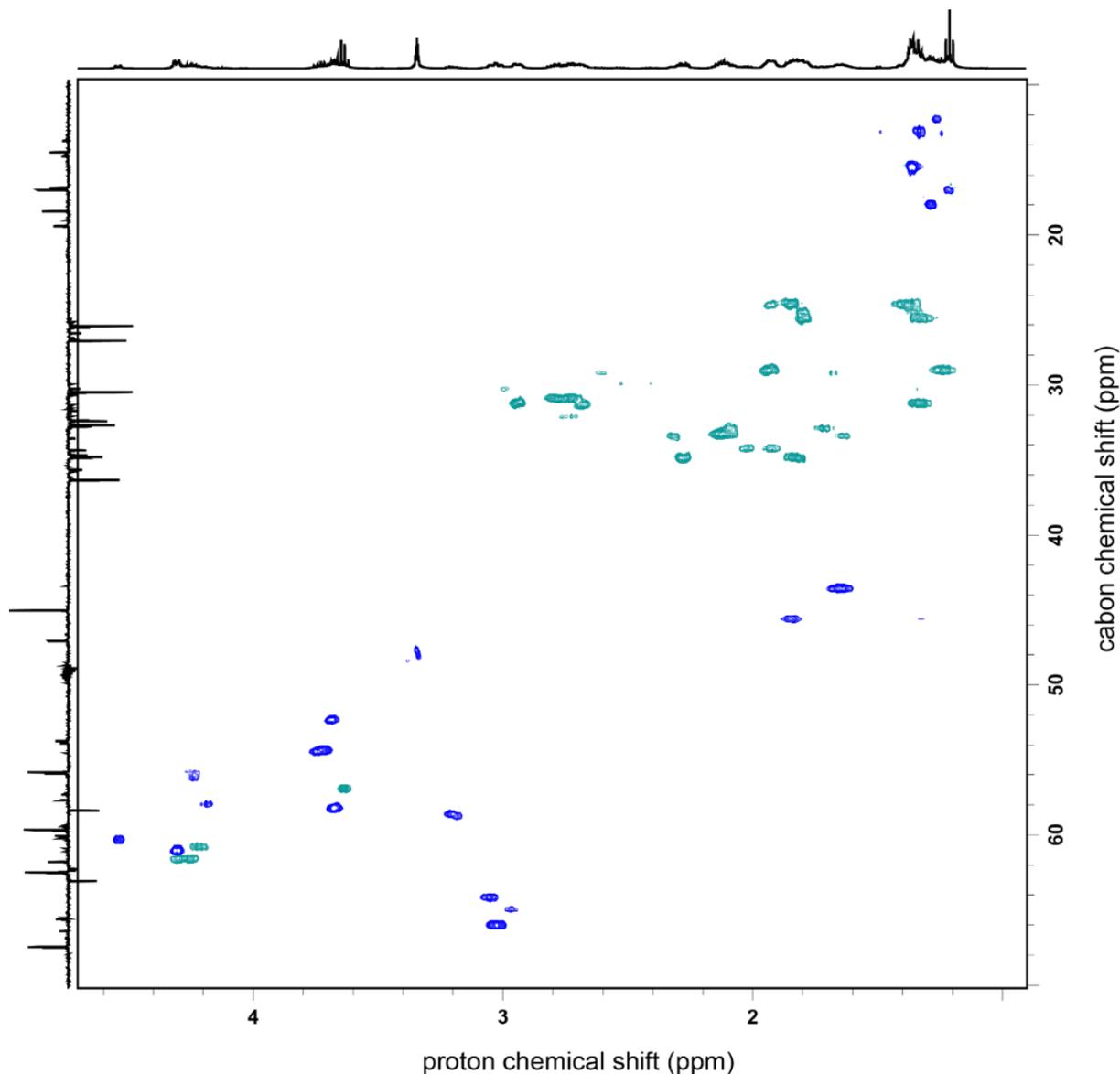


Figure 16. Spectre RMN 2D  $^{13}\text{C}$ - $^1\text{H}$  HSQC enregistré sur 15 mg de Trandolapril dans MeOD à 14.1 T (T = 300 K).

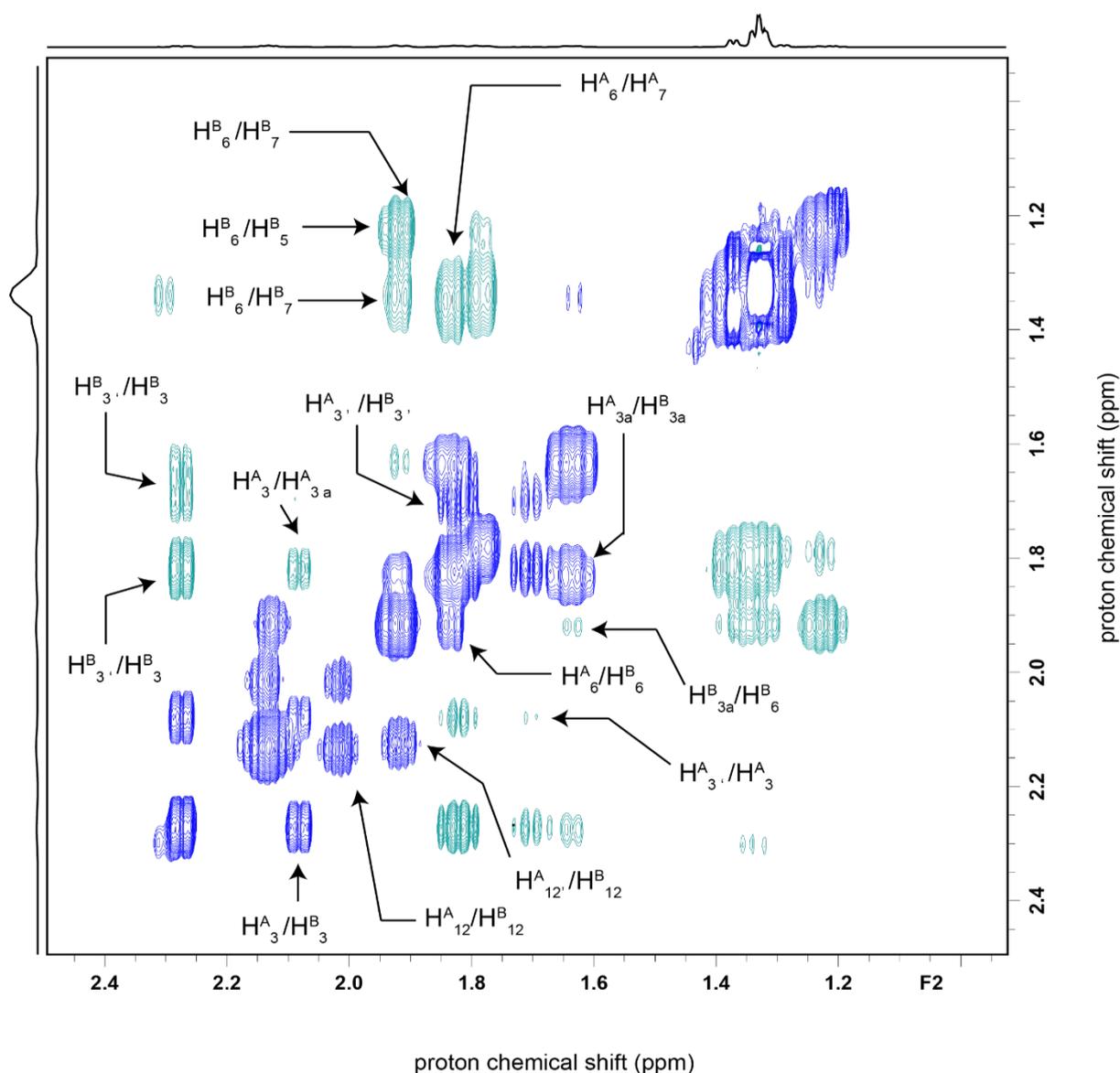
La bonne qualité de ces données nous a cependant encouragés à effectuer une analyse de type 2D EXSY sur cet échantillon, en utilisant une séquence d'impulsions standard, afin (i) les systèmes de spins en échange, et (ii) d'exploiter cette information pour approfondir l'attribution des résonances.

### III. Spectroscopie EXSY

Quelques régions d'intérêt des spectres EXSY 2D enregistrés en utilisant une expérience



de routine sont représentées dans les figures 17, 18 et 19. L'attribution des corrélations a été ajoutée pour permettre une analyse facilitée de ces données. La taille de cette molécule, et donc le temps de corrélation qui peut être associé à sa dynamique sont tels que les corrélations provenant d'un processus de relaxation croisée sont du signe opposé à la diagonale, tandis que les corrélations d'échange sont du même signe.



**Figure 17.** Région sélectionnée n°1 du spectre 2D  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  EXSY enregistré à 300 K sur l'échantillon de Trandolapril.

A la température considérée (300 K), la haute résolution qui a été obtenue permet de

constater que la plupart des signaux se dédoublent sous l'effet d'un régime d'échange lent. On peut également noter que de nombreux contacts nOe sont observés. Leur interprétation est cependant délicate car nous avons vérifié par des simulations (non montrées dans ce manuscrit) que ces contacts peuvent « corrélés » des signaux des deux conformères, ce qui suggère qu'une attribution basée sur l'analyse de ces contacts pourrait mener à l'interprétation de proximités spatiales qui n'ont pas de sens physique.

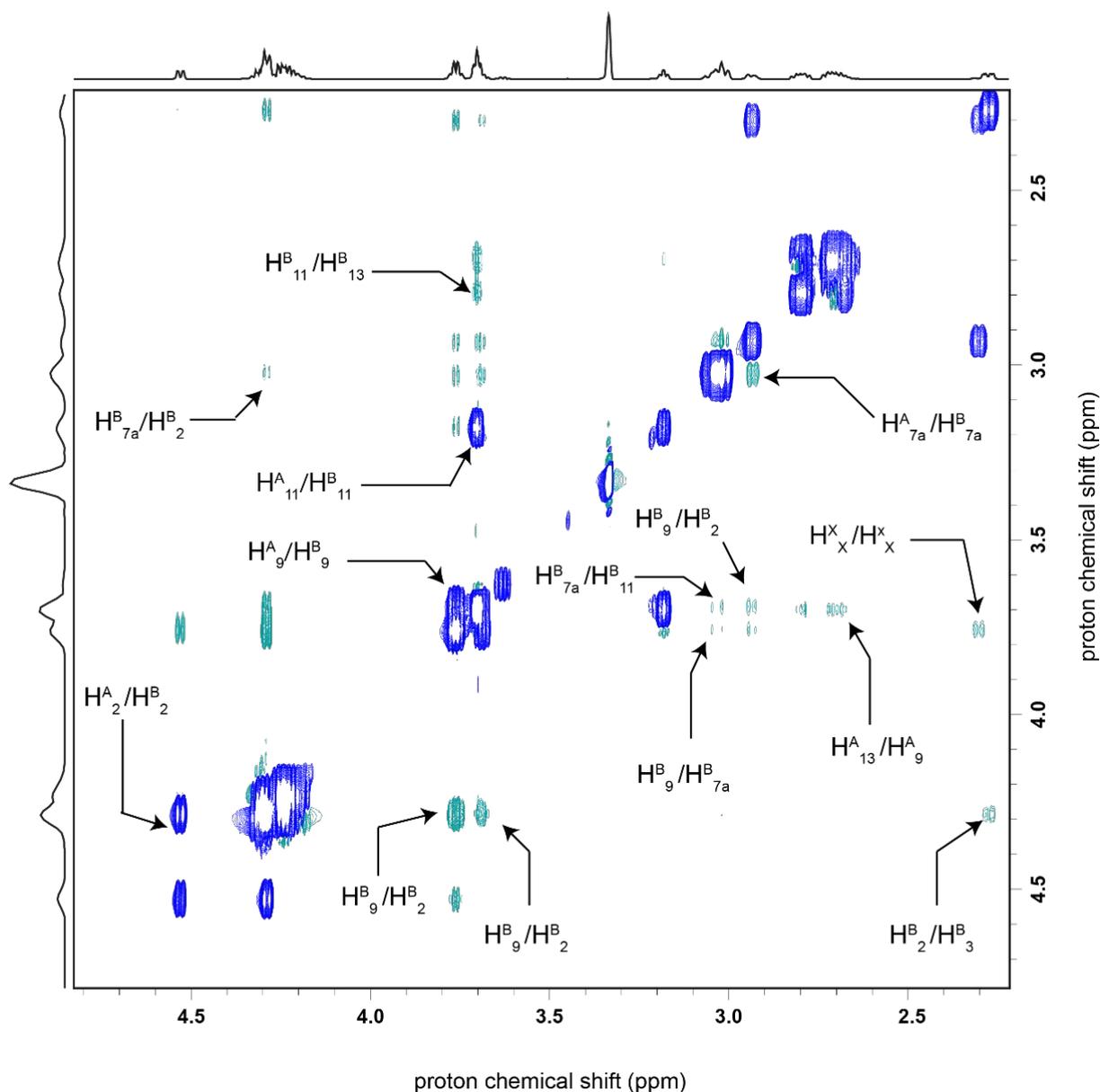
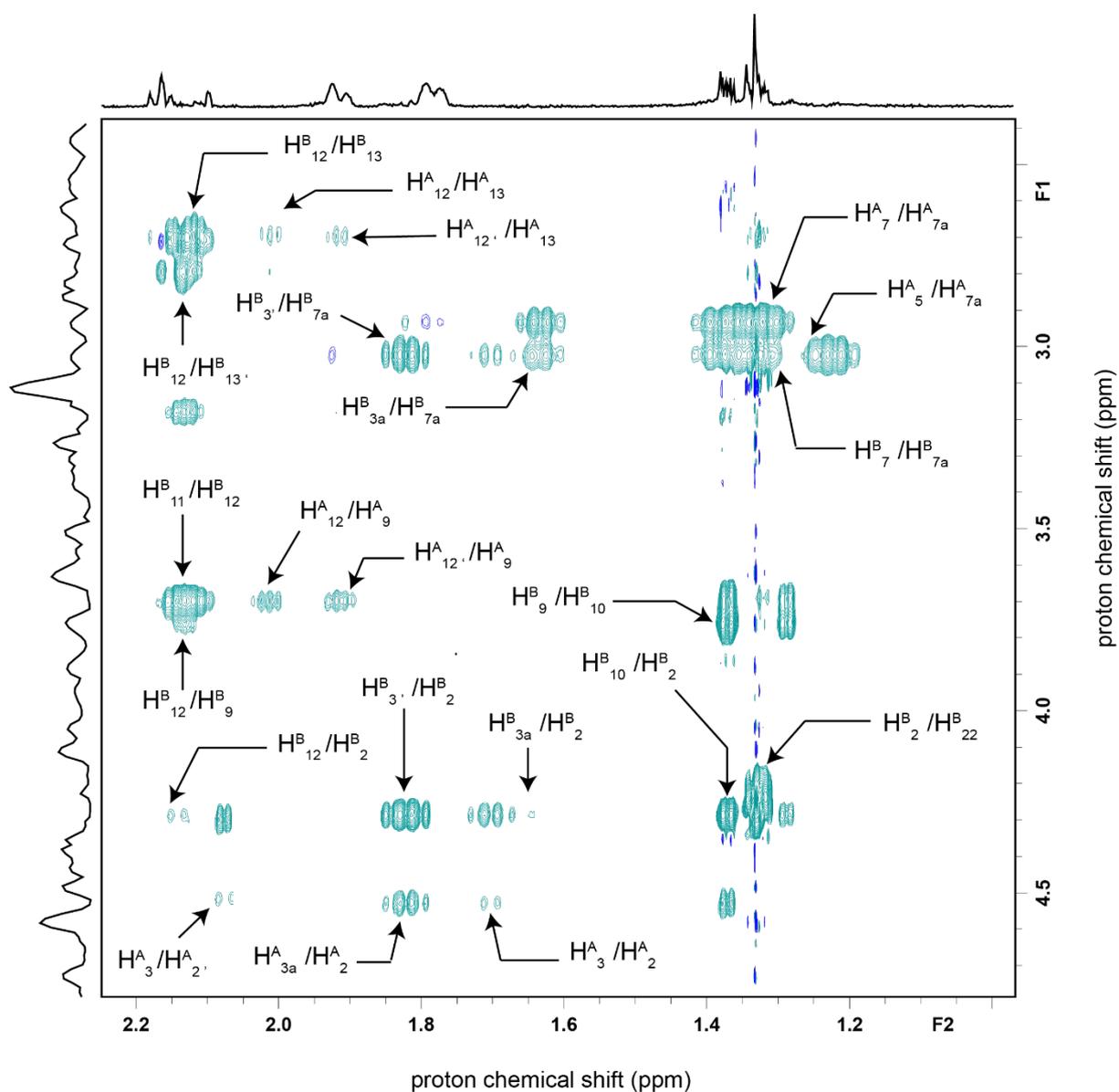


Figure 18. Région sélectionnée n°2 du spectre 2D  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  EXSY enregistré à 300 K sur l'échantillon de

### Trandolapril.

En outre, l'attribution qui a été annotée sur ces spectres permet de constater que de nombreux signaux sont superposés, ce qui constitue une difficulté d'analyse potentielle pour extraire des paramètres dynamiques de l'échange conformationnel à partir de ces données. Pour cette raison, nous avons évalué la faisabilité d'une approche « pure shift » pour améliorer la résolution de ces données.



**Figure 19. Région sélectionnée n°3 du spectre 2D  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  EXSY enregistré à 300 K sur l'échantillon de Trandolapril.**

## IV. Spectroscopie RMN « pure shift »

Nous avons choisi dans notre travail d'évaluer la robustesse des méthodes PSYCHE et ZS pour l'enregistrement de spectres  $^1\text{H}$  « pure shift » du Trandolapril dissout dans le méthanol, dans des conditions expérimentales où l'échelle de temps du processus d'interconversion donne un ensemble de résonances de proton doublées. Nous avons enregistré des spectres RMN  $^1\text{H}$  « pure shift » sur l'échantillon de Trandolapril, d'abord à 300 K, au moyen des différentes séquences présentées dans le chapitre précédent. Il faut noter ici qu'il est difficile d'effectuer une RMN « pure shift » sur des molécules soumises à un échange chimique. En effet, dans le cas de protons en régime d'échange rapide avec le solvant ou d'autres molécules de soluté, il a été souvent observé que leur signal disparaît ou est au moins fortement affecté par de gradients tels que ceux utilisés pour générer un encodage spatial dans certaines méthodes « pure shift » ou encore de refocalisation sélective, comme c'est le cas par exemple pour les méthodes basées sur ZS. Une alternative consiste à utiliser un solvant qui annule ou ralentit la cinétique de l'échange chimique où des protons tels que des groupes hydroxy ou amine qui puissent être observés pour agir sur l'évolution de leur couplage scalaire avec des protons voisins. Dans la partie suivante, nous voulons tirer profit du fait que la cinétique d'échange observée pour le Trandolapril dans les conditions expérimentales choisies est suffisamment lente pour permettre d'évaluer cette approche.

### IV.A Spectre 1D Push-PSYCHE

Nous avons d'abord utilisé la séquence d'impulsions mise en œuvre avec la méthode PSYCHE<sup>72, 83-84</sup>. La durée de l'impulsion  $\pi/2$  était de 20,2  $\mu\text{s}$  pour le canal  $^1\text{H}$ . Les impulsions de type Chirp ont été centrées à 5,4 ppm et leurs durées ont été définies à 15 ms pour couvrir environ 10 kHz avec une amplitude de 33,7 Hz et un angle optimisé expérimentalement de 25°. Les gradients de champ pulsés utilisés pour la sélection des transferts de cohérence ont été réalisés avec des

---

83 M. Foroozandeh, R. W. Adams, M. Nilsson, G. A. Morris *Journal of the American Chemical Society*. **2014**, 136, 11867-11869.

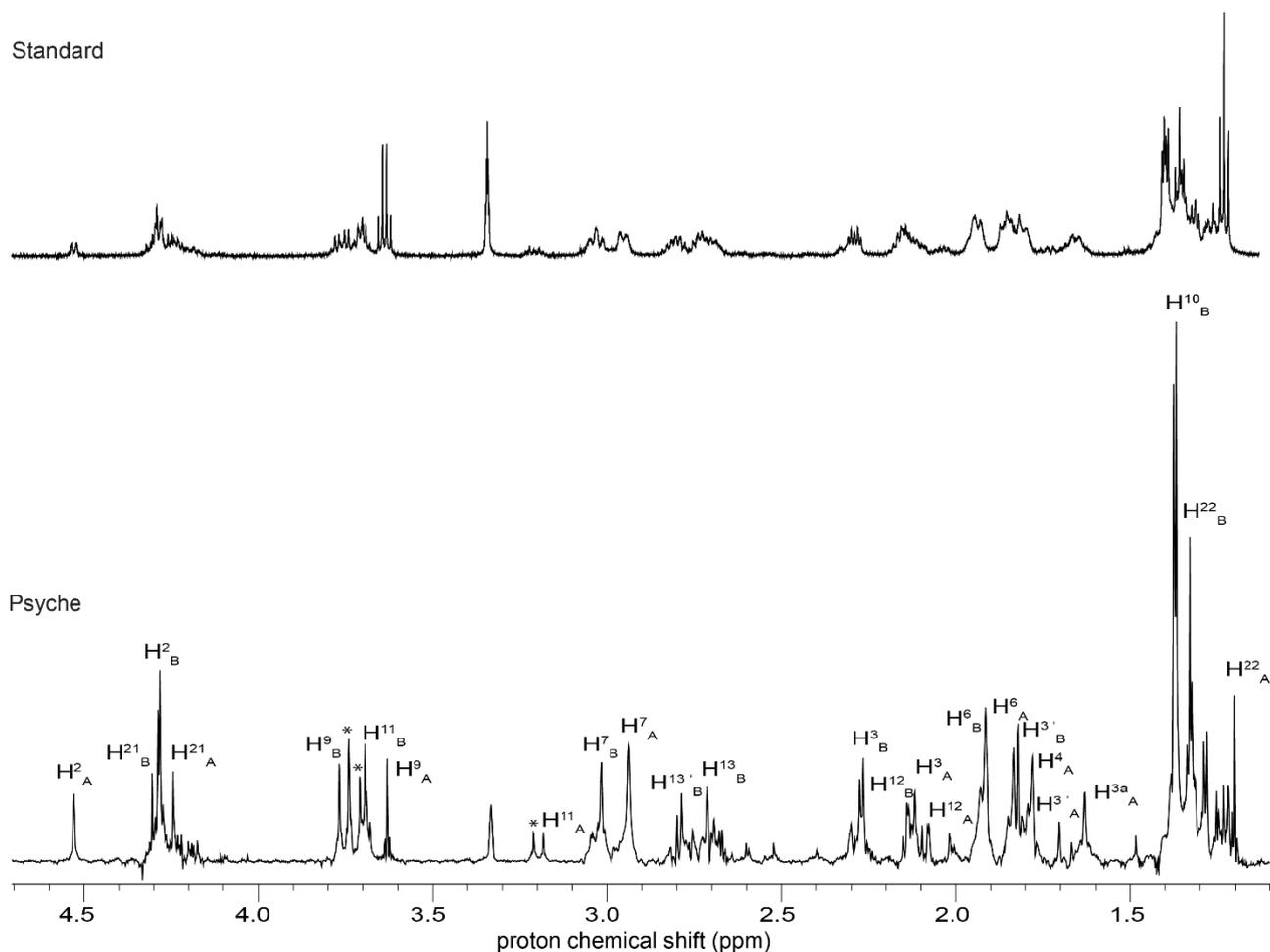
84 M. Foroozandeh, R. W. Adams, N. J. Meharry, D. Jeannerat, M. Nilsson, G. A. Morris *Angewandte Chemie (International Ed. in English)*. **2014**, 53, 6990-6992.



amplitudes respectives de  $40,8 \text{ G.cm}^{-1}$  et  $26,0 \text{ G.cm}^{-1}$  et une durée de 1 ms pour chacun. L'amplitude de l'impulsion de gradient alignée avec le centre du pulse Chirp constitué des deux impulsions à modulation de fréquence a été optimisée expérimentalement à  $0,53 \text{ G.cm}^{-1}$ . Toutes les impulsions de gradient ont été suivies d'un délai de récupération de  $150 \mu\text{s}$ . Le FID « pure shift » a été reconstruit à partir de l'acquisition d'une série de 32 morceaux (ou « chunks ») de 20 ms chacun. Les fenêtres spectrales en F1 (dimension indirecte) et F2 (dimension directe) ont été définies à 33 Hz et 4500 Hz, respectivement. Nous avons utilisé un nombre de scans égal à 4 et un temps de recyclage ( $D_1$ ) entre les scans de 1,5 s. Les données pseudo-2D résultantes ont été traitées à l'aide de la macro pshift pour générer le signal 1D.

Le spectre « pure shift » obtenu au moyen de cette séquence est représenté en Figure 20. On observe une série de singulets présents à la fréquence de résonance des différents protons de l'échantillon. L'attribution qui a pu être faite au moyen de l'ensemble des données de cette étude est également reportée sur ce spectre, et permet de constater qu'à priori tous les signaux espérés sont présents, hormis dans quelques zones qui seront discutées plus loin, pour lesquelles l'efficacité de la méthode de découplage n'a pas été suffisante.





**Figure 20.** Spectre RMN  $^1\text{H}$  enregistré sur le Trandolapril dissout dans MEOD à 300 K en utilisant une séquence d'impulsion pseudo 2D mettant en œuvre le bloc PSYCHE de découplage homonucléaire.

#### IV.B Spectre 1D Push-ZS

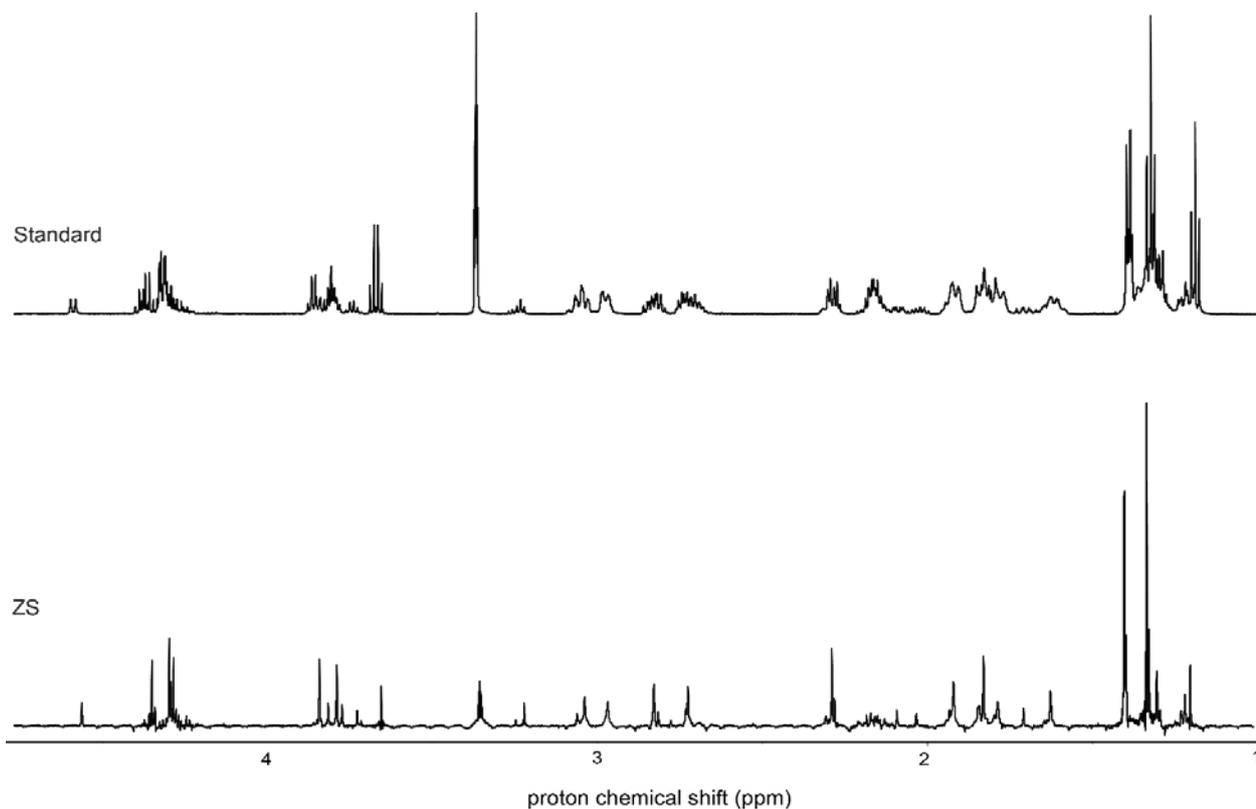
Nous avons également acquis un spectre « pure shift » mettant en œuvre la méthode ZS pour pouvoir effectuer une comparaison entre cette méthode et la méthode PSYCHE. Pour mémoire, la méthode ZS est significativement moins sensible, mais la méthode PSYCHE souffre intrinsèquement du fait qu'elle génère des artefacts qui peuvent être problématiques dans un échantillon complexe où une espèce minoritaire doit être détectée.

Nous avons mis en œuvre la séquence pseudo-2D introduite au chapitre précédent. Les paramètres d'acquisition ont été choisis de manière à générer un spectre de résolution identique à celui enregistré avec la méthode PSYCHE. Chaque incrément en  $t_1$  a été acquis en accumulant 16 scans, avec un temps de recyclage de 4s. Pour le bloc de refocalisation, une impulsion de



type Re-Burp de 120 ms associée à un gradient d'encodage de  $0.4 \text{ G.cm}^{-1}$  a été mise en oeuvre.

Le spectre « pure shift » acquis avec cette méthode est représenté en figure 21. Il faut d'abord noter que la sensibilité de ce spectre est bien inférieure à celle du spectre PSYCHE. Cependant, on observe à nouveau la totalité des signaux, et l'allure générale de ce spectre laisse apparaître peu d'artefacts, essentiellement liés à la reconstruction du signal par la méthode interférométrique, et en tout cas plus faibles que pour la méthode PSYCHE.

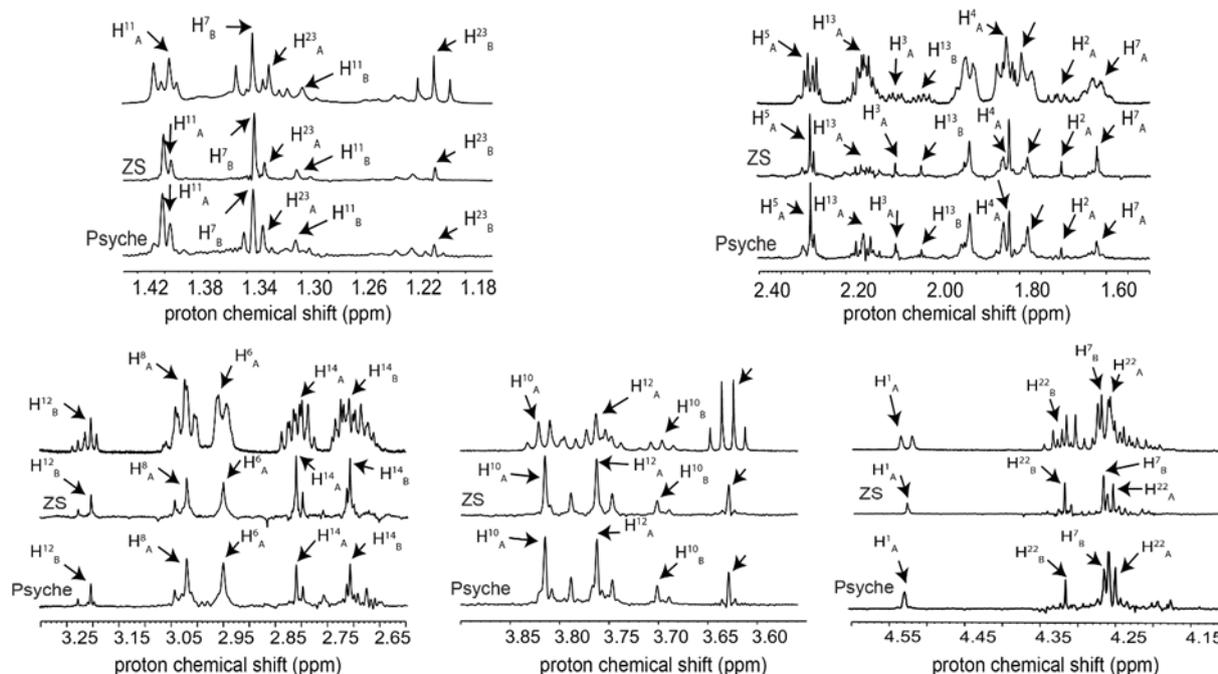


**Figure 21.** Spectre RMN  $^1\text{H}$  enregistré sur le Trandolapril dissout dans MEOD à 300 K en utilisant une séquence d'impulsion pseudo 2D mettant en œuvre le bloc ZS de découplage homonucléaire.

Les deux expériences « pure shift » « ZS » et « PSYCHE », nous ont permis d'obtenir des spectres proton sous découplage homonucléaire du Trandolapril avec un temps d'analyse d'une dizaine de minutes. Le choix de la méthode doit donc se faire en fonction de ce que l'on souhaite : une plus grande sensibilité au prix d'important artefact ou moins d'artefact au prix d'une moindre sensibilité

#### IV.C Comparaison des méthodes ZS et PSYCHE

Il convient de rappeler que la méthode PSYCHE permet une sensibilité plus élevée que la méthode ZS et donc acquérir des ensembles de données en un temps expérimental réduit, parfois au prix d'artefacts spectraux, qui doivent être évalués dans le contexte de l'analyse du mélange contenant potentiellement une forme mineure. La figure 22 montre les spectres  $^1\text{H}$  standard, « pure shift » PSYCHE et « pure shift » ZS enregistrés sur le Trandolapril. Pour les deux méthodes de découplage, nous avons observé comme attendu une simplification des multiplets observés sur le spectre standard et une séparation nette des signaux avec des déplacements chimiques proches. Par exemple, les deux résonances du proton  $\text{H}_{10}$  dans chaque conformère A (trans) et B (cis) sont clairement résolues, alors qu'un chevauchement du signal de  $\text{H}_{12}$  empêchait leur analyse sur le spectre standard.



**Figure 22. Comparaison des spectres RMN 1D  $^1\text{H}$  standard (haut), « pure shift » ZS (milieu) et « pure shift » PSYCHE (bas) enregistrés sur le Trandolapril.**

Nous avons cependant remarqué que les deux méthodes de découplage sont moins efficaces sur les protons résonants entre 4,15 et 4,40 ppm, ce qui peut s'expliquer par la présence de protons couplés avec des déplacements chimiques très proches, comme cela a été discuté par ailleurs. Quelques artefacts dus à la reconstruction de bloc, sont également observés mais sont



suffisamment faibles pour permettre la mise en œuvre de ces deux approches dans une approche EXSY « pure shift ». Ces résultats préliminaires sont par ailleurs cohérents avec ce qui pouvait être attendu de chaque méthode, PSYCHE étant nettement plus sensible, et ZS produisant moins d'artefacts, notamment au pied des pics. Il faut également remarquer que les performances des deux approches sont comparables pour les systèmes de spins fortement couplés, en utilisant une impulsion sélective de type Reburp pour la méthode ZS.

Dans la suite de ce travail, nous avons (i) évalué le gain de résolution apporté par ces méthodes de découplage homonucléaire pour générer des cartes TOCSY « pure shift » destinées à faciliter l'attribution du composé, puis (ii) mis en œuvre la méthodologie ainsi optimisée dans une analyse de type EXSY « pure shift ».

#### IV.D Spectre TOCSY 2D « pure shift »

La séquence TOSY 2D « pure shift » a été rendue populaire il y a quelques années par l'équipe de Gareth Morris, car elle constitue l'une des premières expériences de corrélation (donc multi-dimensionnelle) offrant le gain de résolution apporté par le découplage homonucléaire.<sup>73, 85</sup> Nous avons mis en œuvre cette expérience en l'appliquant à l'échantillon de Trandolapril pour générer des cartes de corrélations destinées à faciliter l'attribution des résonances de cet échantillon. Cette expérience incorpore le bloc de découplage homonucléaire dans la dimension indirecte d'une expérience TOCSY (avec bloc de mélange de type MLEV), comme décrit au chapitre précédent. Pour chacun des 4096 incréments en  $t_1$ , un signal d'induction de 4096 points a été acquis avec 8 scans. Les fenêtres spectrales sont d'environ 8 ppm dans les deux dimensions. La période de mélange (MLEV) est de 80 ms, entourée par deux impulsions de « spin lock » de 2.5 ms. Les données ont été traitées en utilisant du « zéro filling » jusqu'à 1024 points en  $t_1$  et 4096 points en  $t_2$ , une apodisation avec une fonction QSINE Le mode de quadrature utilisé est TPPI et une correction automatique de ligne de base a été appliquée dans les deux dimensions.



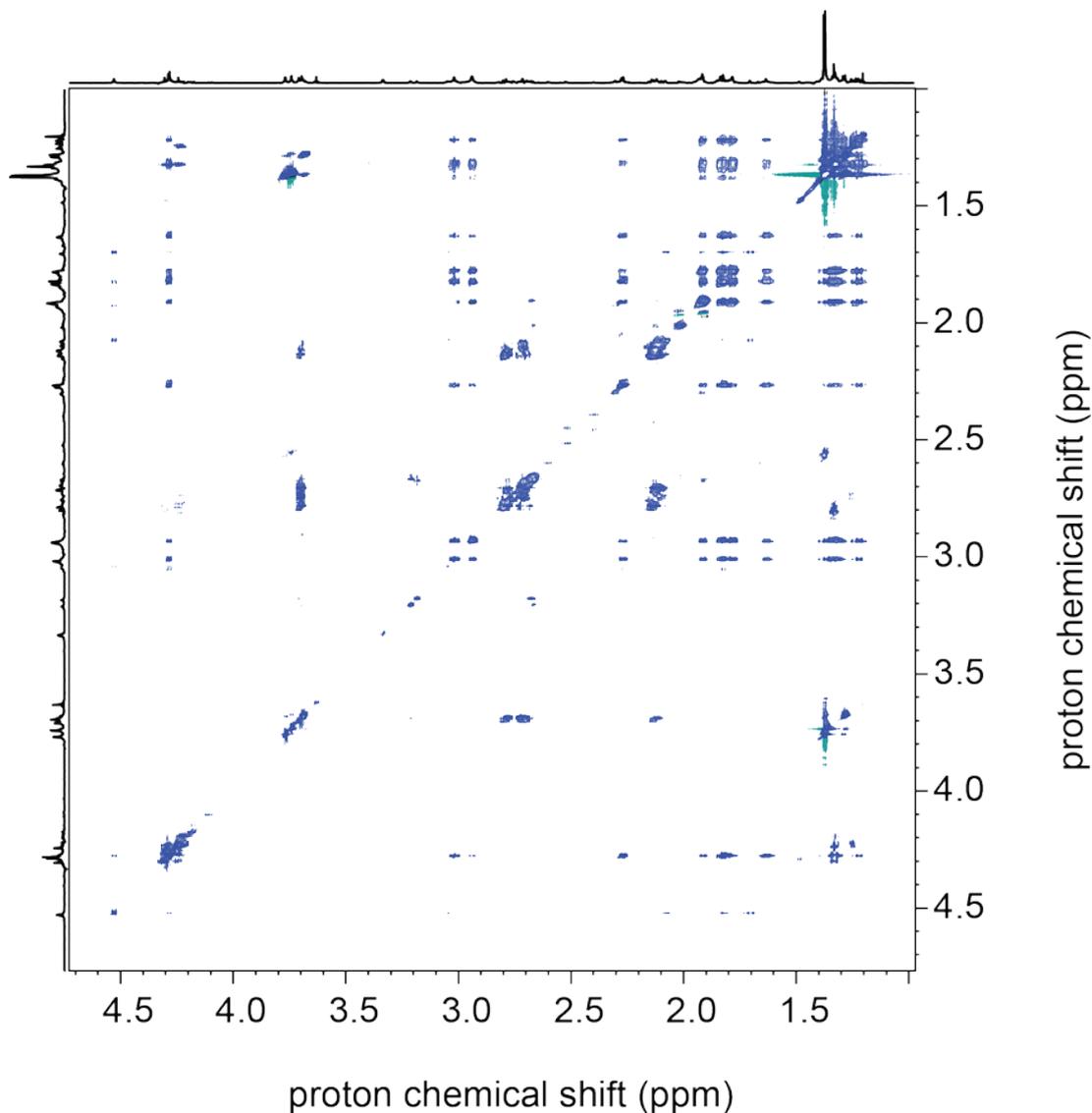


Figure 23. Spectre RMN 2D Tocsy  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  enregistré sur 15 mg du Trandolapril dans MEOD avec la méthode de découplage homonucléaire PSYCHE à 14.1 T et T= 300K.

G. Morris et son équipe ont montré que la dimension « pure shift » de ce spectre peut être « transférée » à l'autre dimension du spectre par l'opération mathématique nommée covariance, pour obtenir un spectre symétrique par rapport à sa diagonale, où chaque corrélation à une structure de singulet dans les deux dimensions.

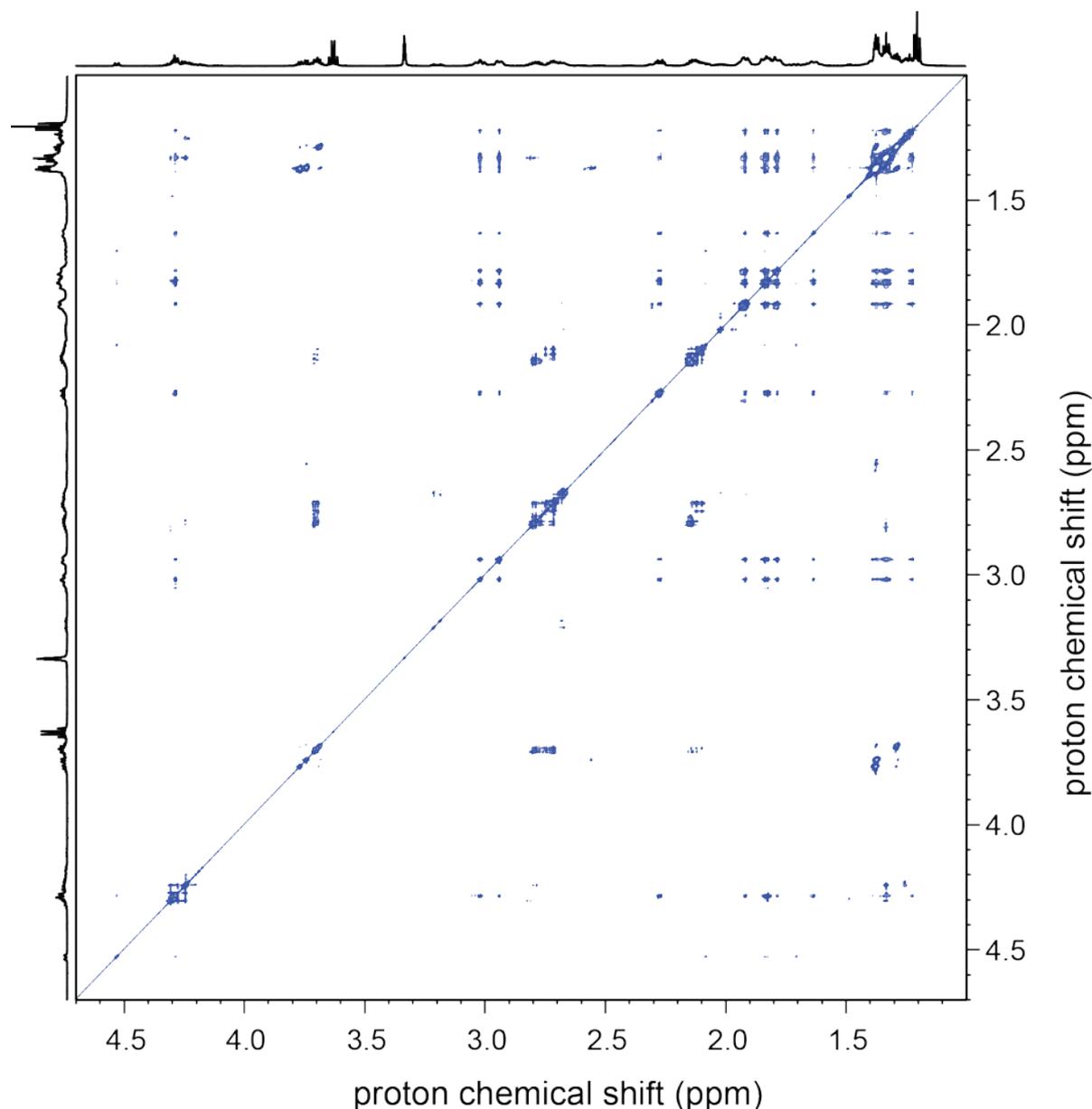


Figure 24. Spectre RMN 2D Tocsy  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  enregistré sur 15 mg du Trandolapril dans MEOD avec la méthode de découplage homonucléaire PSYCHE à 14.1 T et  $T=300\text{K}$  avec la covariance.

#### IV.E Attribution

L'ensemble des cartes de corrélation 2D standard et « pure shift » présentées ci-dessus ont permis d'identifier les deux conformères à 300 K, et de réaliser l'attribution de la plupart de leurs signaux, comme résumé dans le tableau ci-dessous. Il est à noter d'une part que quelques différences d'attribution sont apparues par rapport à la seule publication existante qui

rapporte une étude RMN du Trandolapril, ce qui est peut-être dû à la différence de conditions expérimentales (solvant ...) entre les deux études. D'autre part, nous avons également observé au moins un autre composé, dont les signaux qui sont également en échange semblent suivre la même distribution d'environnements électroniques que ceux du Trandolapril, ce qui suggère une forme minoritaire, dérivée du Trandolapril. Malheureusement, les mesures faites sur cet échantillon n'ont pas permis d'identifier avec certitude l'ensemble des signaux de cette (ces) forme(s) et une étude complémentaire sera nécessaire pour l'identifier.

**Tableau 2. Attribution des résonances  $^1\text{H}$  du Trandolapril dans MeOD à 300K.**

CARBONE	CONFORMERE A (TRANS)		CONFORMERE B (CIS)	
	$\delta$ C (ppm)	$\delta$ H (ppm)	$\delta$ c (ppm)	$\delta$ H (ppm)
1				
2	CH	4.53	CH	4.28
3	CH <sub>2</sub>	1.70/ 2.08	CH <sub>2</sub>	1.82/ 2.27
3a	CH	1.83	CH	1.63
4	CH <sub>2</sub>	1.78	CH <sub>2</sub>	?
5	CH <sub>2</sub>	1.20	CH <sub>2</sub>	1.20
6	CH <sub>2</sub>	1.83	CH <sub>2</sub>	1.92
7	CH <sub>2</sub>	1.35	CH <sub>2</sub>	1.33/ 2.30
7a	CH	2.93	CH	3.03
8				
9	CH	3.68	CH	3.76
10	CH <sub>3</sub>	1.29	CH <sub>3</sub>	1.37
11	CH	3.18	CH	3.70
12	CH <sub>2</sub>	1.91/ 2.03	CH <sub>2</sub>	2.13
13	CH <sub>2</sub>	2.68	CH <sub>2</sub>	2.80/ 2.73
14				
15, 19	CH aro		CH aro	
16, 18	CH aro		CH aro	
17	CH aro		CH aro	
20				
21	CH <sub>2</sub>	4.23	CH <sub>2</sub>	4.29
22	CH <sub>3</sub>	1.32	CH <sub>3</sub>	1.33
23				



---

## **CHAPITRE III. MISE EN ŒUVRE D'UNE EXPERIENCE EXSY « PURE SHIFT »**

---



L'existence d'un équilibre conformationnel S-cis/ S-trans autour de la liaison peptidique a été expliqué par le dédoublement des pics relatifs aux Trandolapril. Il faut rappeler ici qu'un profil chromatographique similaire a également été observé pour quelques peptides <sup>28</sup> et IECA contenant la proline comme le lisinopril <sup>33</sup> l'énalaprilate.<sup>34</sup> De nombreux travaux de recherche ont montré la performance de la chromatographie en phase liquide pour mettre en évidence l'existence de l'équilibre conformationnel ou l'isomérisation S-cis/S-trans. L'enjeu de ce travail est donc de valider une méthode basée sur la RMN pour réaliser une étude susceptible de mettre en évidence l'existence de l'échange conformationnel du Trandolapril, avec un niveau d'information atomique qui surpasse ce que la chromatographie en phase liquide peut apporter.

Nous nous concentrons au cours de cette étude sur l'analyse du Trandoalpril comme système modèle pour développer des expériences 2D EXSY avec découplage homonucléaire. Deux stratégies ont été explorées, selon que le bloc de découplage homonucléaire est placé au milieu du délai d'évolution indirect ( $t_1$ ), ou inséré dans le délai d'acquisition. Dans ce dernier cas, le spectre 2D est acquis en utilisant la méthode interférométrique, ce qui correspond à acquérir un jeu de données de type pseudo-3D.

## I. Développement méthodologique : implémentation d'un découplage homonucléaire dans l'expérience EXSY

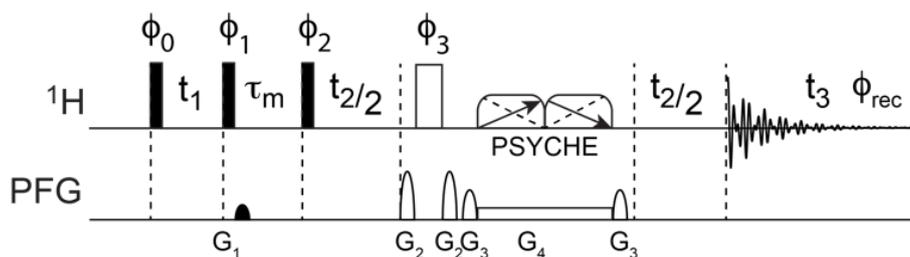
### I.A Spectre EXSY 2D « pure shift » en F2

Récemment, Thiele et al. ont rapporté une expérience NOESY « pure shift » de Zangger-Sterk (ZS) basée sur une méthode d'acquisition interférométrique du signal, qui permet l'enregistrement de spectres NOESY 2D <sup>40</sup>, dont les corrélations montrent une structure de singulet dans la dimension spectrale « directe » reconstruite. Cette simplification de la forme de raie observée permet de réduire le chevauchement des pics, ce qui contribue à augmenter considérablement la résolution. Il a été démontré que la qualité des données obtenues permettait de quantifier l'effet Overhauser nucléaire (nOe) et d'extraire les contraintes de distance dérivées du nOe avec une bonne précision pour les petits composés organiques. Thiele et al. ont également étudié comment le traitement des données peut permettre de réduire les artefacts dus au paramètres d'acquisition.

Dans notre travail, nous proposons d'utiliser cette approche pour enregistrer des spectres EXSY « pure shift » et améliorer la qualité de l'analyse des échanges chimiques. Nous évaluons



d'abord la robustesse des paramètres d'acquisition de découplage homonucléaire<sup>74</sup> optimisés dans le cas particulier d'un échantillon soumis à un échange chimique<sup>86-89</sup>. Pour cela, nous avons d'abord mis en œuvre une légère évolution de la séquence d'impulsions introduite par Thiele et al. dans laquelle nous avons utilisé la méthode PSYCHE.<sup>69,90</sup> pour effectuer un découplage homonucléaire (Figure 25). Dans cette expérience, l'aimantation transverse préparée par le premier pulse d'excitation évolue pendant le délai d'évolution indirect  $t_1$ , puis est rabattue selon l'axe z pour subir tous les processus de relaxation longitudinale, relaxation croisée (nOe) et échange chimique, durant le temps de mélange  $\tau_m$ . La troisième impulsion  $\pi/2$  rebascule l'aimantation dans le plan transverse pour qu'elle soit détectée. Un bloc de découplage homonucléaire est alors appliqué au milieu du délai  $t_2$  au cours duquel les couplages scalaires sont alors refocalisés, tandis que l'interaction de déplacement chimique contribue à l'évolution nette de l'aimantation. Un bloc de données est alors acquis pendant  $t_3$ , qui est suffisamment court pour négliger l'évolution des couplages scalaires. Le signal total est reconstruit en enregistrant des fractions de points (ou chunks) pendant le délai  $t_3$ , pour chaque incrément de  $t_2$ .



**Figure 25.** Séquence d'impulsions de l'expérience PSYCHE « pure shift » en F2. Les impulsions de refocalisation de  $180^\circ$  sont représentées par des formes noires et blanches sur le canal proton. Les impulsions polychromatiques de  $90^\circ$  et de  $180^\circ$  sont respectivement représentées par des rectangles noirs et blancs. Les impulsions gradient d'encodages et celle de nettoyage sont respectivement représentées par des rectangles blancs et des formes blanches sur le canal gradient (PFG).

86 P. Sakhaii, B. Haase, W. Bermel, R. Kerssebaum, G. E. Wagner, K. Zangger *J Magn Reson.* **2013**, 233, 92-95.

87 J. Mauhart, S. Glanzer, P. Sakhaii, W. Bermel, K. Zangger *Journal of Magnetic Resonance.* **2015**, 259, 207-215.

88 M. G. Concilio, P. Kiraly, G. A. Morris *Journal of Magnetic Resonance.* **2019**, 301, 85-93.

89 N. H. Meyer, K. Zangger *Angewandte Chemie (International ed. in English).* **2013**, 52, 7143-7146.

90 J. A. Aguilar, S. Faulkner, M. Nilsson, G. A. Morris *Angew Chem Int Ed Engl.* **2010**, 49, 3901-3903.



Nous avons acquis une série de spectres EXSY « pure shift » au moyen de la séquence présentée ci-dessus, pour différents temps de mélanges permettant de sonder le processus d'échange conformationnel. Pour chacun des 14 chunks acquis pour reconstruire la dimension directe, et des 460 incréments en  $t_1$ , un FID de 1024 points a été acquis avec 4 scans et un délai de recyclage de 1 s. Les fenêtres spectrales sont de 7.5 ppm dans les deux dimensions. Les données finales ont été traitées après reconstruction en appliquant un « zero filling » jusqu'à 1024 points en F1 et 4096 points F2, une apodisation de type  $\sin^2$  (QSINE) dans les deux dimensions et une correction de ligne de base. Le spectre EXSY « pure shift » obtenu sur l'échantillon de Trandolapril pour un temps de mélange de 1.2 s est représenté en Figure 26.



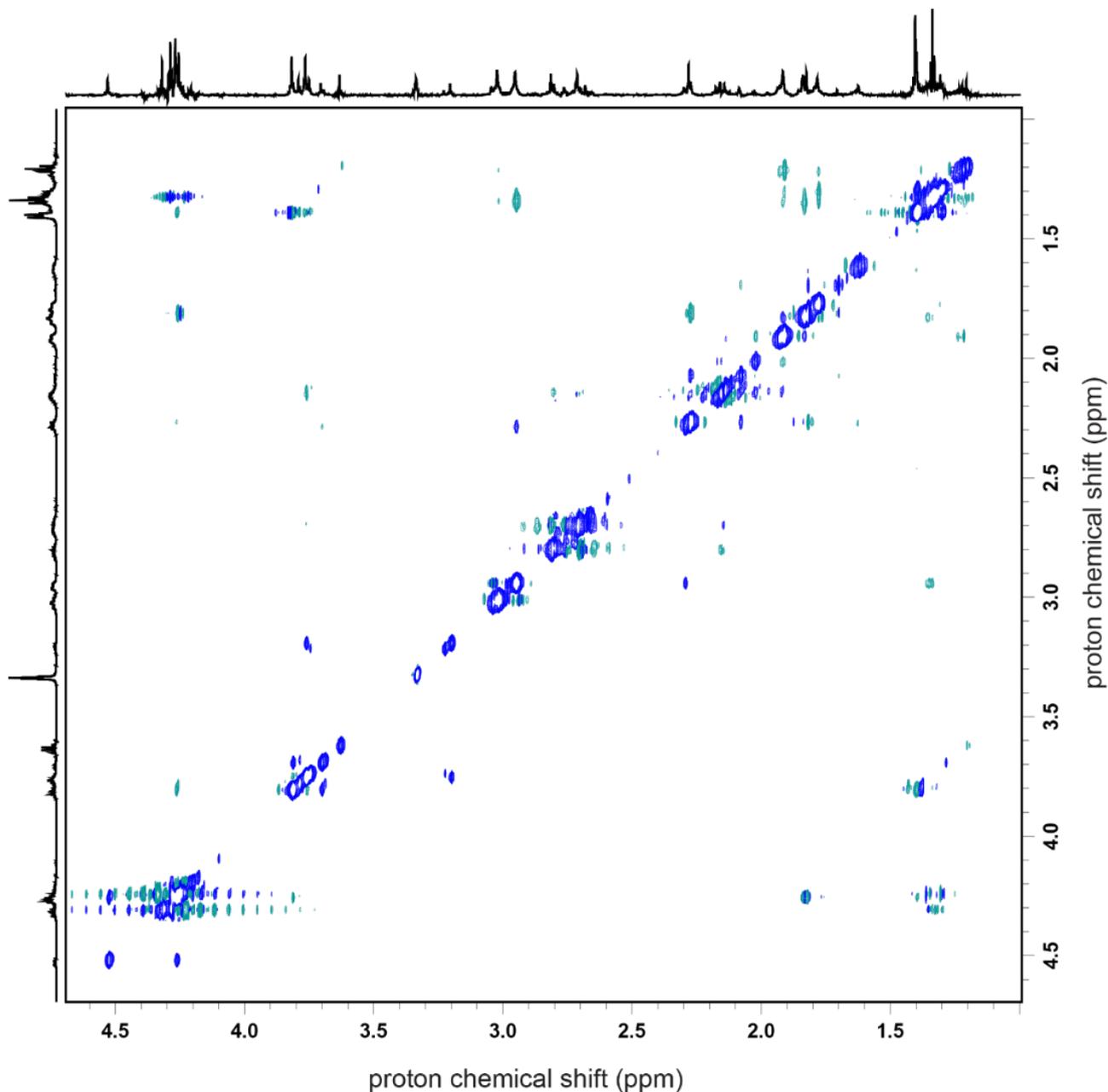


Figure 26. Spectre RMN 2D EXSY « pure shift »  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  enregistré sur 15 mg du Trandolapril dans le MEOD avec la méthode de découplage homonucléaire PSYCHE (T= 300K).

Nous avons comparé les spectres EXSY « pure shift - F2 » avec les cartes 2D obtenues dans les mêmes conditions en utilisant la séquence standard sans découplage homonucléaire. Les deux spectres sont représentés en Figure 27 pour le même temps de mélange de 1.2 s. La même résolution digitale a été obtenue et un traitement identique a été appliqué aux spectres standards et « pure shift ».

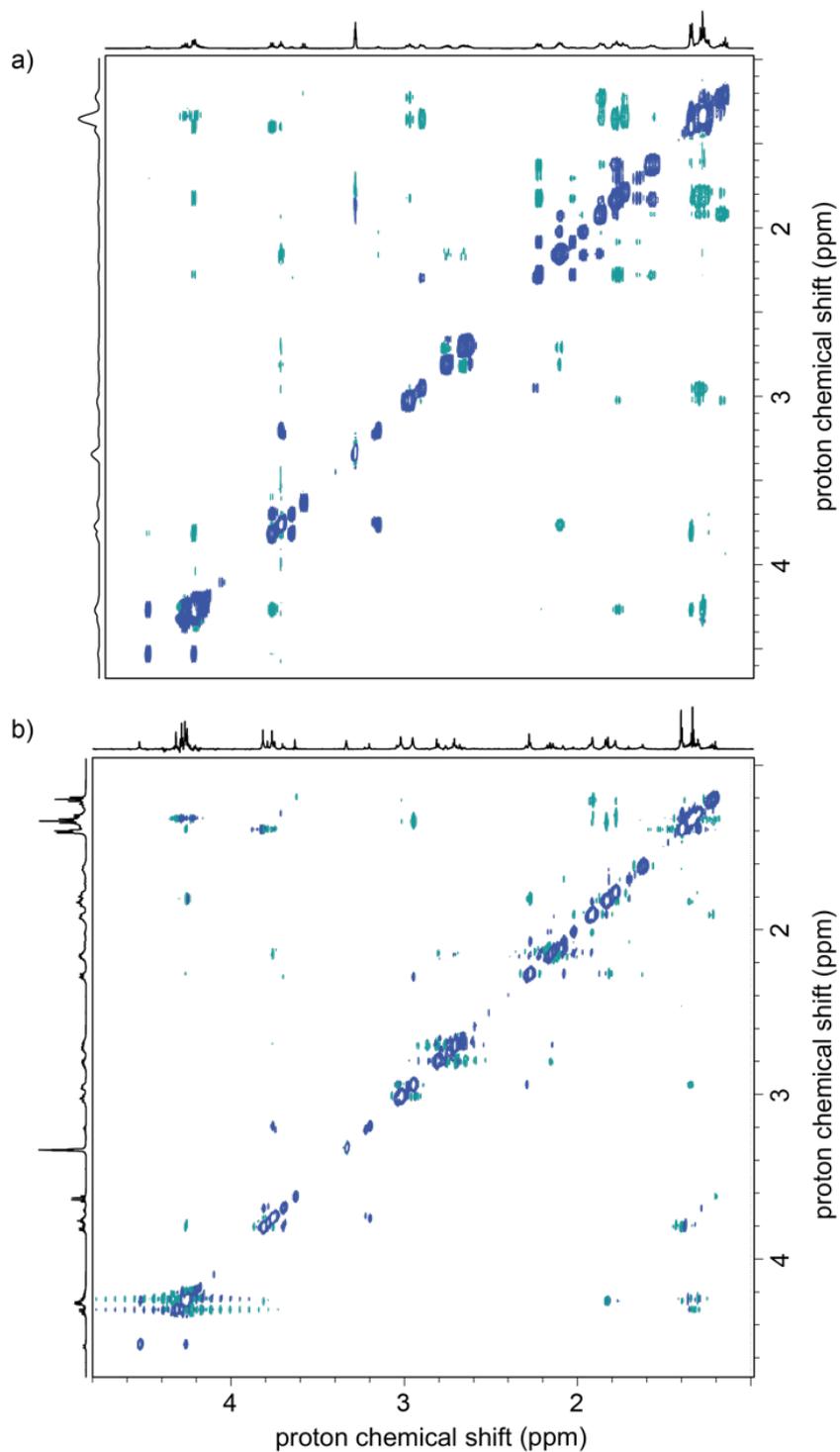


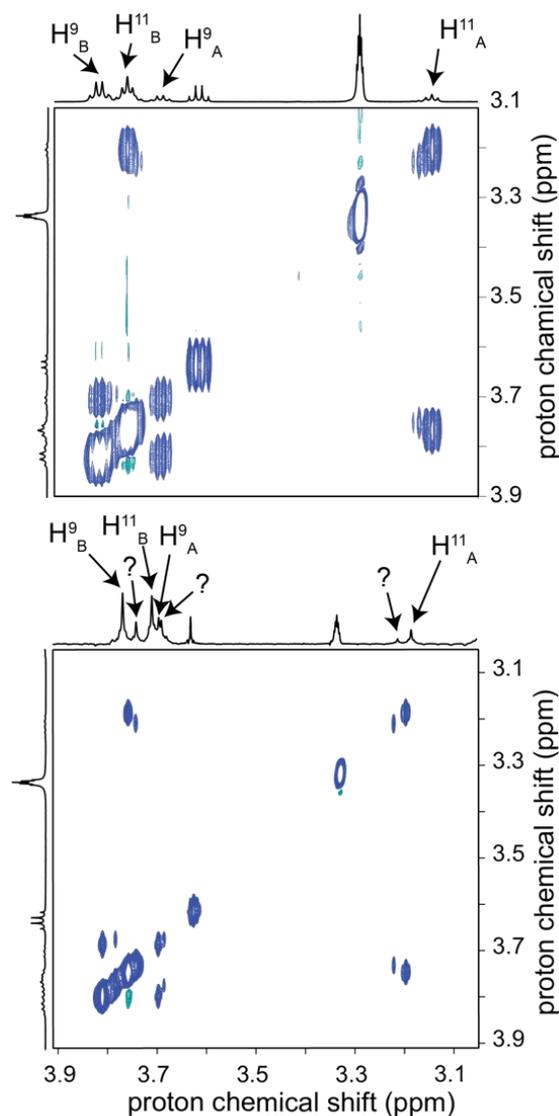
Figure 27. Spectres 2D EXSY enregistrés sur l'échantillon de Trandolapril a) en 1h en utilisant une séquence standard, et b) en 14h en utilisant la séquence EXSY « pure shift » avec découplage

**homonucléaire PSYCHE pour la dimension F2 ( $\tau_m = 1,2$  s, T = 290 K).**

Nous avons observé un schéma de corrélation très similaire sur chaque spectre, notamment pour les corrélations EXSY (contacts positifs) qui mettent en évidence les échanges chimiques. Les seules régions où des artefacts sont observés correspondent à des spins de protons couplés avec des déplacements chimiques proches identifiés comme étant difficiles à découpler pour la méthode PSYCHE lors de notre étude préliminaire. Des artefacts de troncature sont également observés pour les corrélations impliquant des protons du groupe éthyle  $C^{21}H_2-C^{22}H_3$ .

La figure 28 met en évidence l'amélioration de la résolution dans la région comprise entre 3,1 et 3,9 ppm.





**Figure 28.** Région sélectionnée des spectres EXSY standard et F2-PSYCHE-EXSY présentés dans la Figure 27.

Sur le spectre standard, seuls les contacts résultant de l'échange chimique impliquant les noyaux de protons  $H^9$  et  $H^{11}$  ont été clairement identifiés et de forts chevauchements de signaux sont observés. La même région tirée du spectre EXSY « pure shift » nous a permis de résoudre ces corrélations et montre en outre 2 autres systèmes de corrélation plus faibles qui étaient cachés dans l'expérience standard. Ces signaux, qui correspondent aux protons d'une molécule soumise à un processus d'échange, comme le soulignent les contacts EXSY qui les corrélient, sont observés à proximité de plusieurs signaux dédoublés attribuables au Trandolapril. Nous n'avons toutefois pas pu déterminer si ce système de spins pouvait être pleinement

observé sur nos données, ce qui nous aurait permis de conclure à une forme mineure potentielle découlant du Trandolapril. D'autres analyses seront nécessaires pour identifier le composé correspondant à ces signaux qui n'a pas été décrit.

Ces résultats suggèrent que le processus d'interconversion entre les conformères A et B peut être sondé avec une meilleure précision, sur un plus grand nombre de sites de protons résolus en utilisant une approche EXSY pur shift. Nous avons ensuite étudié l'influence de la qualité de ces données sur la détermination des paramètres cinétiques et thermodynamiques de l'équilibre conformationnel. Dans la suite, nous avons évalué la qualité des paramètres cinétiques et thermodynamiques qui sont extraits de l'analyse des corrélations mesurées sur des ensembles de données EXSY « pure shift ». Au préalable, nous présentons les autres alternatives que nous avons explorées pour mettre en oeuvre un découplage homonucléaire pour améliorer la résolution de cartes de type EXSY.

### I.B Spectre EXSY 2D « pure shift » en F1

Suite aux résultats obtenus avec l'approche « F2-PSYCHE-EXSY », nous avons étudié l'approche alternative « F1-PSYCHE-EXSY », qui doit donner accès à une carte de corrélation qui est le symétrique de la première approche, c'est à dire dans laquelle les corrélations ont une structure de singulet dans la dimension F1, et de multiplet dans la dimension F2. L'intérêt de cette approche réside dans le fait qu'elle ne nécessite pas l'acquisition de données de type « pseudo-3D » coûteuse en temps expérimental. Nous avons donc implémenté le même bloc de découplage homonucléaire de type PSYCHE au milieu du délai d'évolution indirecte  $t_1$  (Figure 29 - page suivante).

Nous avons enregistré l'expérience F1-PSYCHE-EXSY correspondante. La figure 30 (page suivante) montre le spectre 2D qui a été obtenu dans les mêmes conditions expérimentales que pour le spectre F2-PSYCHE-EXSY précédent.

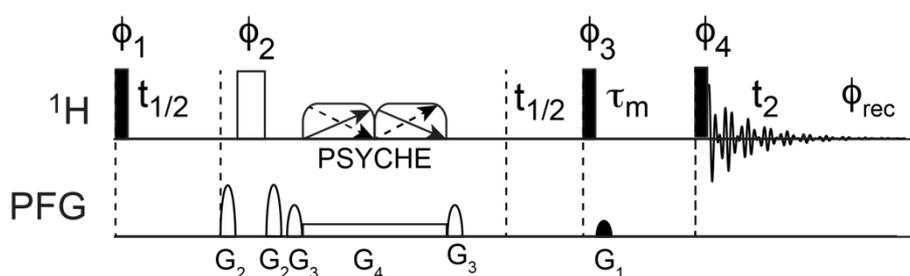


Figure 29. Séquence d'impulsions de l'expérience F1-PSYCHE-EXSY. Les phases d'impulsions sont  $\phi_1 = x -x$ ,  $\phi_2 = x x x x y y y y$ ,  $\phi_3 = x x y y x x y y$ ,  $\phi_4 = x x x x x x x x -x -x -x -x -x -x -x$ ,  $\phi_{rec} = x -x x -x -y y -y y -x x -x x y -y y -y$

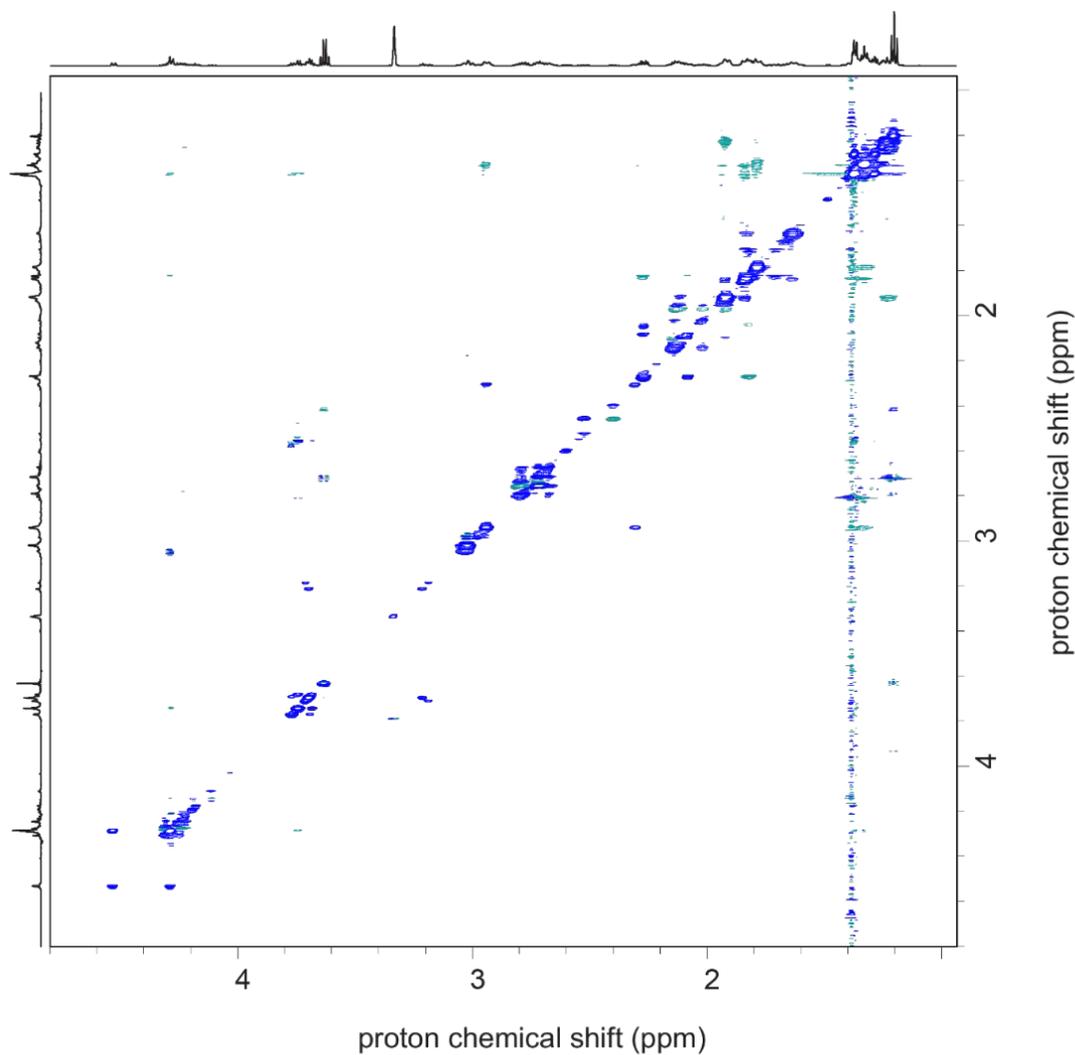


Figure 30. Spectre RMN 2D EXSY « F1-PSYCHE-EXSY »  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  enregistré sur l'échantillon de Trandolapril (T= 300K) en 8h.

Nous observons que la résolution est similaire pour les deux expériences F1-PSYCHE-EXSY et F2-PSYCHE-EXSY (une comparaison plus détaillée de ces expériences sera faite après la section suivante).

### I.C Spectre EXSY 2D « pure shift » en F2 avec méthode ZS

Nous avons également évalué la possibilité d'utiliser la méthode ZS pour effectuer le découplage homonucléaire des cartes EXSY. En effet, en dépit d'une plus faible sensibilité, la méthode ZS génère moins d'artefacts que la méthode PSYCHE. D'autre part, alors que celle-ci est décrite dans la littérature comme étant moins efficace sur les systèmes de spins couplés ayant des déplacements chimiques proches, ses performances se sont révélées équivalentes à celles observées pour la méthode PSYCHE pour notre échantillon. La figure 31 montre le spectre F2-ZS-EXSY qui a été obtenu pour un temps de mélange de 1.2 s.

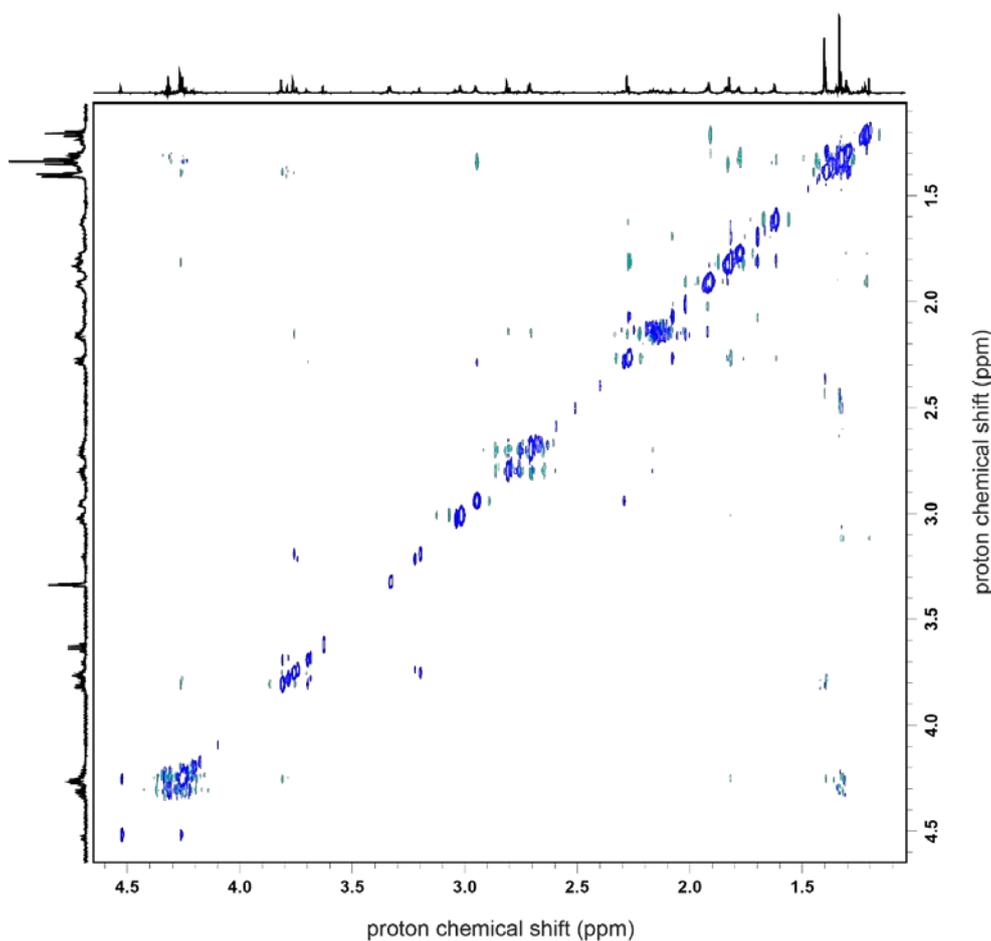


Figure 31. Spectre RMN 2D F2-ZS-EXSY « pure shift »  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  enregistré sur l'échantillon de Trandolapril avec la méthode de découplage homonucléaire ZS ( T= 300K) en 1 jour 6 heures 22min .

## I.D Comparaison entre les différentes approches

Nous avons sélectionné dans la figure 32 une région d'intérêt permettant une comparaison aisée de la résolution permise par chaque approche mise en oeuvre dans cette étude : EXSY standard, F2-ZS-EXSY, F1-PSYCHE-EXSY et F2-PSYCHE-EXSY. Nous remarquons d'abord que dans la gamme de vitesse d'échange de cet échantillon, qui se situe dans un régime lent se traduisant par un dédoublement des signaux en échange, les 3 approches conduisent à une amélioration de la résolution qui permet une grande simplification des données. Nous avons notamment constaté que la méthode ZS est la plus performante en termes de résolution, puisqu'elle a produit les raies les plus fines, avec un minimum d'artefacts. Cependant, la très faible sensibilité de cette méthode nécessite des temps d'analyse très longs par comparaison avec les autres approches, ce qui ne permet pas d'envisager une étude complète basée sur la méthode ZS, sans un travail supplémentaire de développement méthodologique pour améliorer la sensibilité de celle-ci. En ce qui concerne la méthode PSYCHE, nous remarquons que la qualité des données est toutefois acceptable avec des artefacts modérés, et que le gain de résolution est comparable dans les 2 approches F1-PSYCHE-EXSY et F2-PSYCHE-EXSY. Nous notons que le spectre F1-PSYCHE-EXSY qui a été enregistré en 8 heures requiert comme prévu un temps d'analyse plus court que F2-PSYCHE-EXSY (14 h). Il faut cependant remarquer que ce gain de temps n'est pas aussi important qu'on pouvait s'y attendre, car de nombreux incréments doivent être enregistrés dans le F1-PSYCHE-EXSY pour reconstruire la dimension indirecte et bénéficier de l'amélioration de la résolution apportée par le bloc « pure shift ». De manière générale, nous constatons que dès lors qu'une haute résolution doit être atteinte dans une expérience de RMN, le grand nombre de points qui doit être acquis nécessite un temps d'analyse significativement plus long que pour les expériences standard. Dans la suite, nous présenterons une étude du potentiel d'un échantillonnage non uniforme pour répondre à cette limitation. Dans la section suivante, nous avons choisi de retenir l'approche F2-PSYCHE-EXSY et de l'appliquer à l'étude de l'échange conformationnel du Trandolapril. L'autre approche F1-PSYCHE-EXSY aurait pu également être étudiée, mais le potentiel de l'approche F2-PSYCHE-EXSY semble plus important dans la mesure où un gain de temps significatifs pourra être envisagé par la suite en faisant évoluer cette séquence avec un mode d'acquisition en temps réel ou semi-réel, grâce aux consoles électroniques de dernière génération qui sont à présent disponibles.



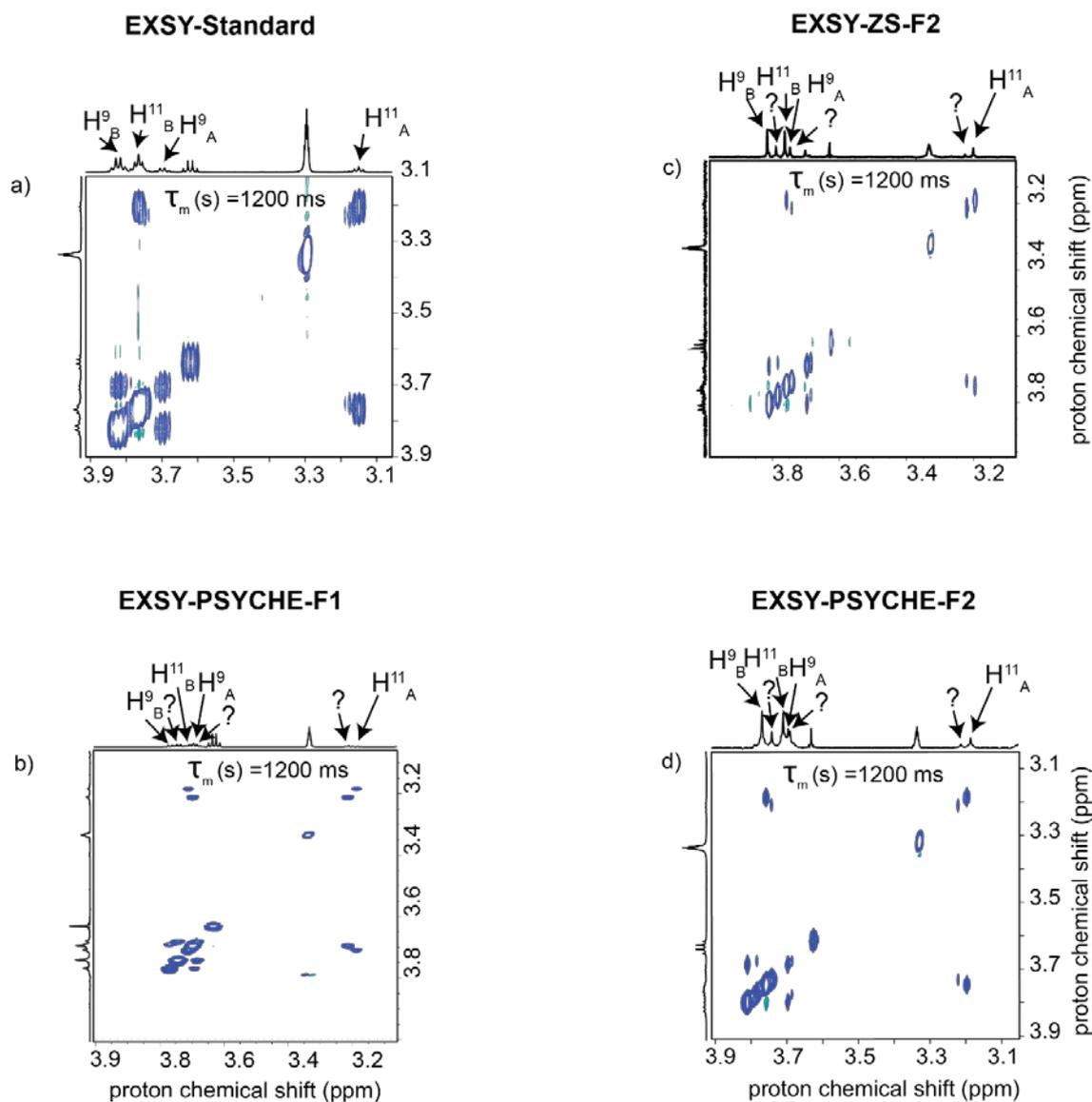


Figure 32. Comparaison des 4 types d'expérience EXSY appliquées à l'échantillon de Trandolapril, illustrée sur la région des cartes comprise entre 3.1 et 3.9 ppm.

## II. Validation d'une méthode d'analyse de l'échange conformationnel

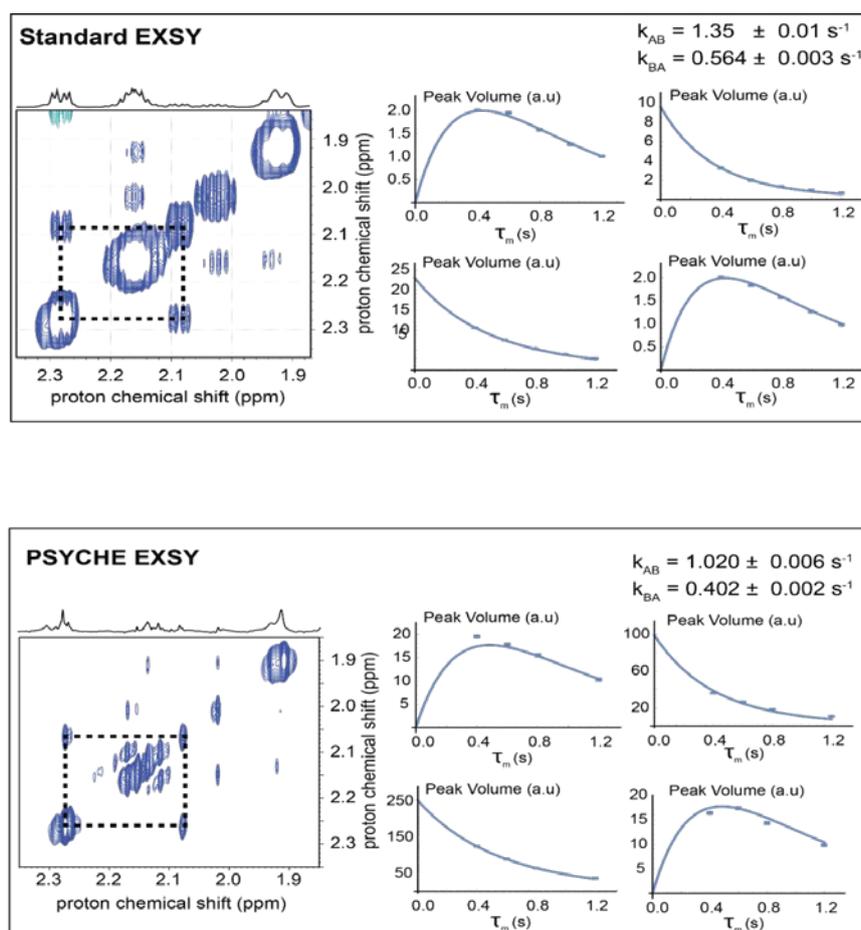
### II.A Détermination des vitesses d'échange $k_{AB}$ et $k_{BA}$

Suite à ces résultats, nous avons enregistré une série de spectres EXSY standard et « pure shift » dont le temps de mélange  $\tau_m$  varie de 400 à 1 200 ms. Pour chaque série de spectres 2D, le volume de tous les modèles de corrélation résolus a été mesuré pour chaque valeur de  $\tau_m$ .

La figure 41 présente les courbes d'évolution en fonction de  $\tau_m$  obtenues pour  $H^{11}$  à 290 K.



Afin d'évaluer l'incertitude expérimentale, nous avons répété 6 fois l'acquisition des expériences EXSY standard et « pure shift » avec  $\tau_m = 1200$  ms. L'écart type calculé au cours de ces 6 expériences pour chaque intégration de corrélation a été supposé constant quel que soit le temps de mélange et a été utilisé comme barre d'erreur pour les différents points des courbes. Nous avons observé que cette incertitude expérimentale est en moyenne légèrement inférieure sur la « pure shift » par rapport aux données de l'approche standard (les courbes d'accumulation obtenues pour d'autres sites protons dans le Trandolapril sont présentées en Annexe).



**Figure 33. Région sélectionnée des spectres 2D NOESY Classic- NOESY PSYCHE pour le système de spin H3 (2.1/2.3 ppm) et l'évolution des courbes d'accumulation en faisant varier le temps de mélange  $\tau_m$  de 0.4 à 1.2s enregistrés à 290 K.**

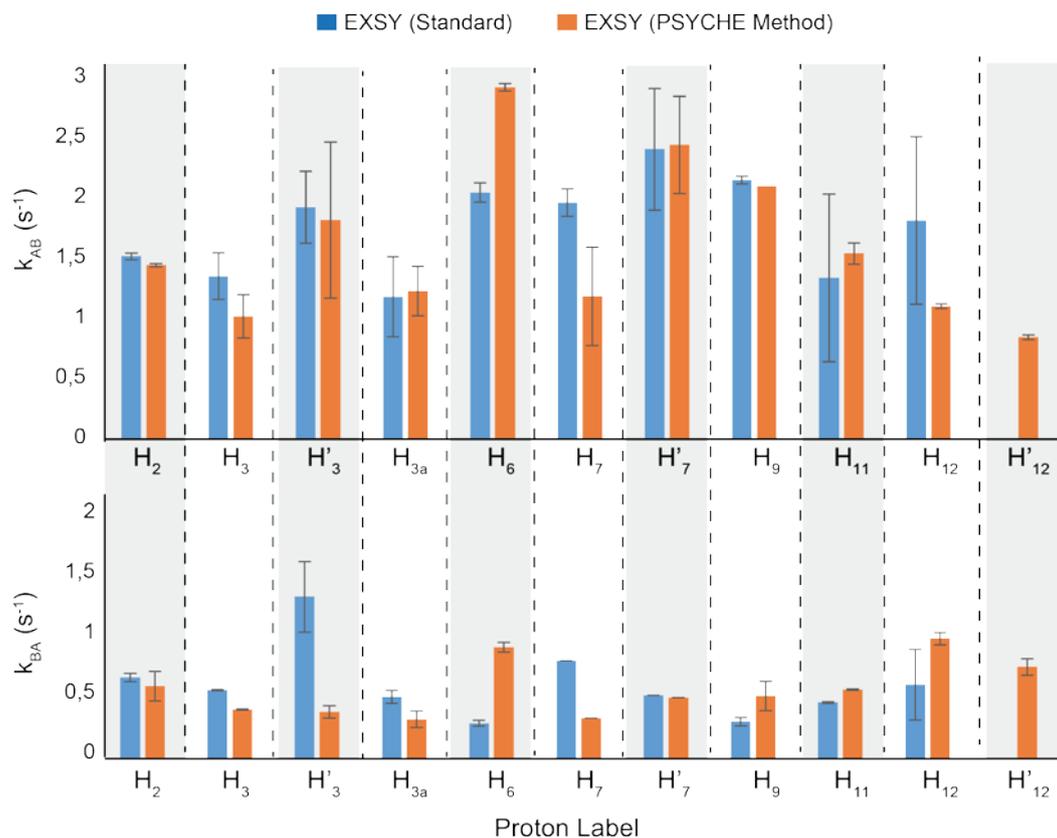
De plus, l'évolution des pics diagonaux et hors diagonaux résultant du processus d'échange entre les espèces chimiques A et B a été modélisée à l'aide des équations de Bloch. Les paramètres de l'équation (1), ont été ajustés, en minimisant la distance entre la courbe du



modèle et les points expérimentaux. Le meilleur ajustement correspond au minimum absolu du facteur de fiabilité qui a été construit à cet effet. Pour chaque jeu de donnée d'EXSY, les courbes bleues représentées à la figure 41 correspondent au meilleur ajustement étudié pour H<sup>3</sup>. Lorsque nous comparons les spectres des deux approches EXSY standard et « pure shift », nous observons que les deux pics diagonaux se chevauchent avec d'autres signaux pour la méthode standard, par contre pour la méthode « pure shift » on observe une meilleure résolution et séparation des signaux. Les barres d'erreur sont cependant similaires, ce qui montre la bonne qualité des données de la méthode « pure shift ». La précision sur la détermination des paramètres de l'échange chimique a été estimée par une analyse d'erreur basée sur la méthode de Monte Carlo (les histogrammes illustrant les distributions des vitesses d'échange  $k_{AB}$ ,  $k_{BA}$  et  $T_1$  pour H<sup>3</sup> sont indiqués en Annexe). Des valeurs moyennes légèrement différentes sont obtenues pour  $k_{AB}$  et  $k_{BA}$ , ce qui est cohérent avec la petite différence de qualité des deux jeux de données décrite ci-dessus.

Nous avons étudié le processus d'échange du Trandolapril sur les 11 différents protons pour chaque conformères A et B, en utilisant les deux approches EXSY standard et « pure shift ». Les valeurs des vitesses d'échange  $k_{AB}$  et  $k_{BA}$  sont présentées dans la figure 33 pour chaque site. Globalement, nous avons observé que les valeurs des vitesses d'échange sont similaires dans les deux jeux de données, à l'exception de quelques protons. Pour H<sup>3</sup>, H<sup>6</sup> et H<sup>12</sup>, les différences entre les valeurs de  $k_{AB}$  (respectivement  $k_{BA}$ ) déterminées par les deux approches EXSY standard et EXSY-PSYCHE proviennent du fait qu'un nombre réduit de corrélations ont été ajustés. Par exemple, il apparaît que la valeur de vitesse d'échange  $k_{BA}$  déterminée pour H<sup>3</sup> à partir des spectres EXSY-Standard est très différente des autres valeurs déterminées sur d'autres sites de proton, ce que nous attribuons à la qualité des donnée (mauvaise résolution) et au chevauchement des signaux entre ces corrélations. De plus, pour H<sup>12</sup>, si l'on compare l'ajustement des corrélations des spectres EXSY standard (3 corrélations) et EXSY PSYCHE (2 corrélations), nous observons une amélioration de résolution apporté par le découplage homonucléaire qui a conduit une détermination plus précise des valeurs de vitesse d'échange déterminé par la dernière approche, ce qui montre l'efficacité de la méthode et suggère que ces valeurs sont plus fiables. L'écart-type déterminé à partir de ces distributions montre également une résolution légèrement meilleure dans les données « pure shift ». Enfin, pour H<sup>7</sup>, les données « pure shift » ont permis d'ajuster toutes les corrélations et ainsi de déterminer les valeurs de vitesse d'échange avec une meilleure précision.





**Figure 34. Diagrammes des vitesses d'échange  $k_{AB}$  et  $k_{BA}$  extraits pour les différents sites de protons du Trandolapril à 300 K. Les barres d'erreur correspondent à deux fois l'écart type des distributions générées par une analyse d'erreur basée sur Monte Carlo.**

De même, pour H'<sup>12</sup>, de forts chevauchements de signaux dans les données EXSY standard ne permettent pas d'ajuster les corrélations attribuées à ce site de protons, alors que les spectres F2-PSYCHE-EXSY permettent un ajustement précis.

Au final, tout en tenant compte des problèmes particuliers abordés ci-dessus, nous observons que la fluctuation des vitesses d'échange déterminés d'un site de proton à un autre est comparable pour les ensembles de données de l'approche standard et « pure shift ». En particulier, les modèles de corrélation suffisamment résolus sur des spectres EXSY standard nous ont permis d'avoir une extraction précise des paramètres du processus d'échange. En conclusion, les résultats des analyses effectuées sur les deux jeux de données EXSY « pure shift » et EXSY standard sont cohérents. Ceci suggère que la méthode de découplage homonucléaire choisie n'induit pas de déviation significative dans la mesure du volume des contacts EXSY. Nous notons cependant que la dispersion globale des valeurs de  $k_{AB}$  et de  $k_{BA}$  est supérieure aux



barres d'erreur évaluées par les simulations de Monte Carlo. Une simulation approximative de cette contribution donne des écarts de l'ordre de 10 à 20% pour la détermination des valeurs de vitesse d'échange, lorsque les courbes d'évolution sont ajustées à un modèle de relaxation qui néglige les transferts nOe. Dans ce qui suit, on supposera que la valeur moyenne de  $k_{AB}$  et de  $k_{BA}$  calculée sur l'ensemble des sites de protons dans le Trandolapril donne une estimation acceptable des valeurs vraies de ces vitesses d'échange.

## II.B Détermination des énergies d'activation $E_{AB}$ et $E_{BA}$

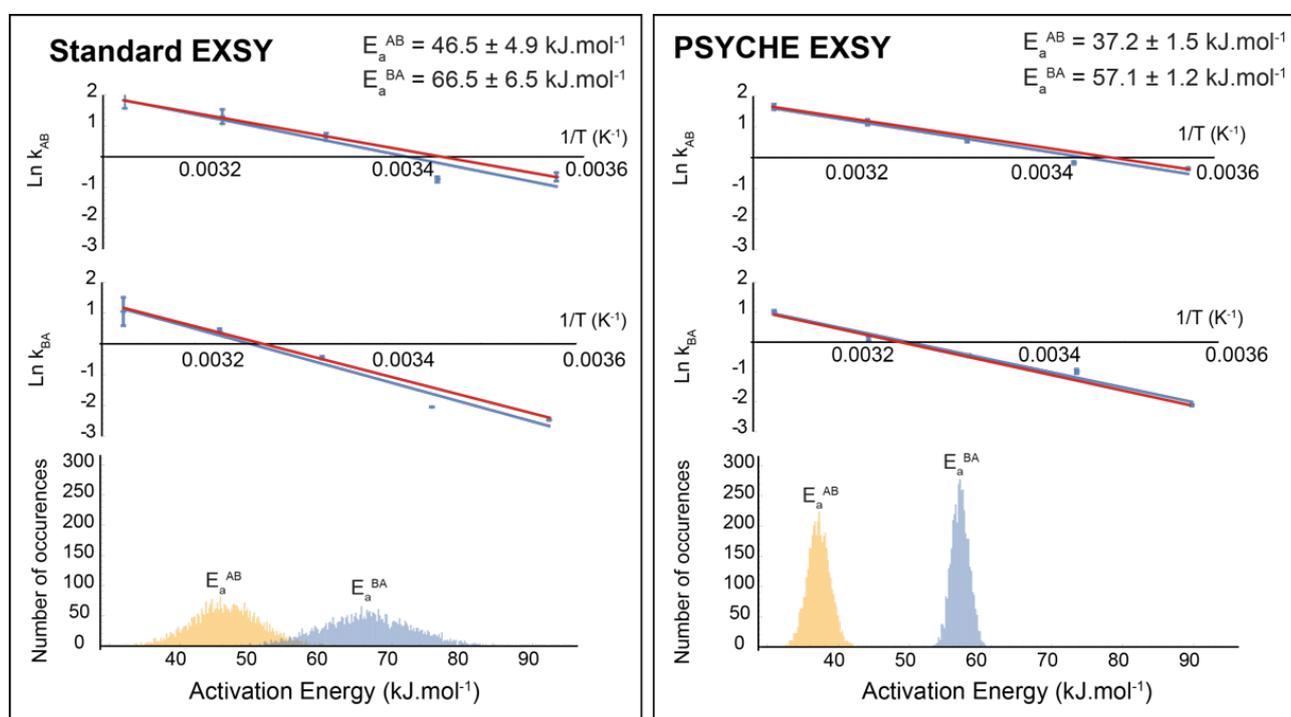
Nous avons également étudié la propagation de l'incertitude expérimentale de nos données lors de la détermination des énergies d'activation du processus d'échange conformationnel. Pour le Trandolapril, les constantes de vitesse  $k_{AB}$  et  $k_{BA}$  et les énergies d'activation correspondantes,  $E_{AB}$  et  $E_{BA}$  sont données par l'équation d'Arrhénius en fonction de la température :

$$k_{AB/BA} = A_{AB/BA} \cdot e^{\frac{-E_{AB/BA}}{k_B T}} \quad (3)$$

où  $A_{AB/BA}$  est le facteur pré-exponentiel et  $k_B$ , la constante de Boltzmann. Nous avons étudié l'influence de la température sur les spectres F2-PSYCHE-EXSY afin de déterminer si cette expérience peut être exploitée afin d'évaluer les énergies d'activation du processus d'échange dans le Trandolapril. Pour cela, nous avons enregistré la série des spectres EXSY standard et « pure shift » à 5 températures différentes de 280 à 320 K. Pour chaque température, la même analyse que celle décrite ci-dessus a été effectuée dans le but d'extraire les valeurs moyennes de  $k_{AB}$  et de  $k_{BA}$  avec une estimation de leur incertitude (la liste des sites de protons pris en compte pour le calcul de ces valeurs moyennes pour chaque température est disponible dans les annexes). Nous avons étudié l'évolution de  $\ln(k_{AB})$  et  $\ln(k_{BA})$  en fonction de  $1/T$ , pour les deux jeux de données EXSY standard et « pure shift » (figure 35). Les courbes bleues correspondent à la régression linéaire appliquée à chaque jeu de données, montrant pour chaque approche une bonne corrélation avec le modèle d'Arrhenius sur la plage de température considérée. Les barres d'erreur qui ont été déterminées pour chaque point de ces tracés d'Arrhenius nous ont amenés à rejeter le point à 290 K qui s'est révélé être une valeur aberrante pour les deux approches. Les spectres 2D obtenus à cette température ont montré une dégradation de la forme des lignes des corrélations, ce qui suggère qu'un problème de stabilité du spectromètre s'est produit. Les courbes d'Arrhenius ont donc été ajustées aux 4 points restants et une estimation des énergies d'activation a été extraite de ces régressions linéaires. De plus, une analyse d'erreur basée sur la méthode de Monte Carlo a été réalisée pour évaluer la propagation de l'incertitude expérimentale dans l'ensemble du flux de travail analytique. Les distributions résultantes des énergies



d'activation  $E_{AB}$  et  $E_{BA}$  sont présentées dans la figure 35. D'une part, nous remarquons que les valeurs moyennes des distributions générées par les approches standard et « pure shift » sont légèrement différentes. L'écart type de chaque distribution d'énergie, augmente considérablement avec l'incertitude de chaque point de données. Cet écart type c'est révélé petit avec l'approche « pure shift ». Par contre, dans les deux cas, la différence d'énergie  $E_{AB} - E_{BA}$  est de l'ordre de 20  $\text{kJ.mol}^{-1}$ , soit le même ordre de grandeur que ce qui a été évalué par calcul DFT<sup>19</sup>. Nous notons cependant que le processus d'échange peut dépendre fortement de tous les facteurs qui influencent la solvation de cette molécule, et notamment de la valeur du pH, une étude plus approfondie de l'influence de la composition de l'échantillon sur cette énergie d'activation sera nécessaire pour pouvoir comparer rigoureusement les résultats expérimentaux et les simulations.



**Figure 35. (haut) Tracés d'Arrhénius représentant l'évolution de  $\ln(k_{AB})$  et  $\ln(k_{BA})$  déterminés en faisant varier la température de l'échantillon, en utilisant les approches EXSY standard et PSYCHE. (bas) Les histogrammes des énergies d'activation  $E_{AB}$  et  $E_{BA}$  qui ont été obtenus par une analyse d'erreur basée sur la méthode de Monte Carlo.**

### III. Etude de l'implémentation d'un échantillonnage non uniforme

La RMN bi-dimensionnelle est un outil extrêmement utile lorsque le spectre 1D classique



est trop complexe. Cependant, les expériences 2D sont caractérisées par un temps d'acquisition plus long, qui pose comme nous l'avons vu un réel problème pratique lorsqu'une série d'expériences 2D doivent être enregistrées pour décrire l'évolution d'un processus mis en jeu pendant l'expérience. Dans ce contexte, afin de rendre la RMN 2D « pure shift » plus accessible pour les analyses de l'échange, des stratégies d'acquisition plus rapide peuvent être utilisées. Une de ces stratégies est l'échantillonnage non-uniforme (Non Uniform Sampling, NUS)<sup>91-92</sup>, qui a déjà commencé à être appliqué<sup>93</sup> pour les mélanges complexes<sup>75</sup>. Cependant, l'intérêt du NUS pour l'étude de l'équilibre conformationnel n'a pas encore été exploré.

### III.A Expérience 2D EXSY avec échantillonnage non uniforme (NUS)

Nous avons enregistré un spectre EXSY avec un taux d'échantillonnage non uniforme de 25%, en utilisant les mêmes paramètres que la méthode standard (Figure 36).

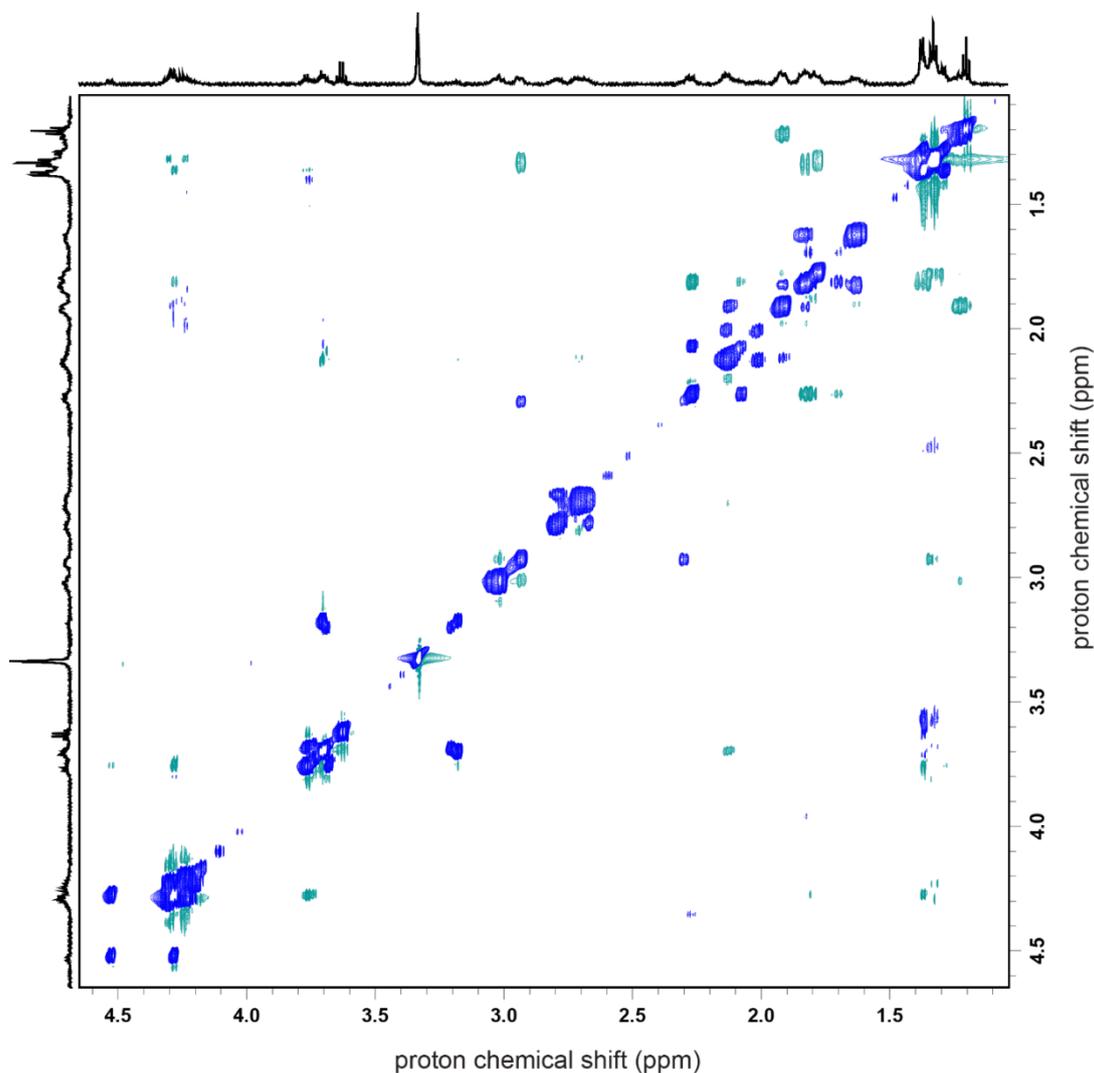
---

91 S. G. Hyberts, G. J. Heffron, N. G. Tarragona, K. Solanky, K. A. Edmonds, H. Luithardt, J. Fejzo, M. Chorev, H. Aktas, K. Colson, K. H. Falchuk, J. A. Halperin, G. Wagner *Journal of the American Chemical Society*. **2007**, *129*, 5108-5116.

92 S. G. Hyberts, H. Arthanari, S. A. Robson, G. Wagner *A special "JMR Perspectives" issue: Foresights in Biomolecular Solution-State NMR Spectroscopy – From Spin Gymnastics to Structure and Dynamics*. **2014**, *241*, 60-73.

93 R. K. Rai, N. Sinha *Analytical Chemistry*. **2012**, *84*, 10005-10011.





**Figure 36.** Spectre RMN 2D EXSY enregistré sur l'échantillon de Trandolapril (T= 300K) avec un taux d'échantillonnage non uniforme de 25% en 52 min.

Le mode d'acquisition utilisé est states-TPPI, pour chaque incrément en  $t_1$ , 4 scans et un délai de recyclage de 2s ont été utilisés. Les fenêtres spectrales et le traitement des données sont également identiques à ceux du spectre EXSY standard enregistré dans les mêmes conditions. Le gain de temps permis par l'implémentation du NUS a été mis à profit pour accumuler un plus grand nombre de scans. Nous observons que le schéma de corrélation des spectres standard (visible dans les sections précédentes) et NUS est très similaire. Ces résultats suggèrent que la méthode d'échantillonnage non uniforme pourrait être mise en œuvre pour l'analyse de l'équilibre conformationnel du Trandolapril avec la même précision que la méthode standard, sans détérioration de la qualité des corrélations. Nous avons par la suite étudié l'influence de la

qualité de ces données sur la détermination des paramètres cinétiques et thermodynamique de l'équilibre conformationnel.

### III.B Détermination des vitesses d'échange $k_{AB}$ et $k_{BA}$

Suite à ces résultats, nous avons enregistré le même protocole qu'avec la méthode EXSY standard : une série de spectre EXSY NUS d'un temps de mélange  $\tau_m$  compris entre 400 et 1200ms. On a mesuré les volumes de corrélation de tous les systèmes de spins du modèle EXSY NUS pour chaque valeur de  $\tau_m$ . Nous avons étudié la reproductibilité pour l'approche EXSY NUS en enregistrant 6 fois la même analyse pour le temps de mélange de 1200 ms, à chaque température étudiée, afin d'évaluer l'incertitude expérimentale.

Nous avons pu ajuster ces volumes par des courbes d'évolution correspondant à un modèle prenant en compte deux conformères cis et trans du Trandolapril, qui a été modélisé par les équations de Bloch modifiées. (Les courbes d'accumulation obtenues pour les autres sites de protons sont présentées en Annexe). Les barres d'erreur ont été déterminées, en simulant 256 (1024) jeux de donnée générés de manière aléatoire à partir d'une distribution normale des mesures des volumes expérimentaux, en prenant comme déviation standard l'incertitude expérimentale sur la mesure des intégrations. Chaque jeu de données virtuel a été analysé en utilisant le protocole d'ajustement décrit ci-dessus et les valeurs des paramètres correspondant au meilleur ajustement ont été recueillies. Les courbes d'évolution des figures 45 et 46, qui correspondent à l'analyse des sites  $H^{11}$  et  $H^7$ , illustrent la reproductibilité de la méthode EXSY NUS, qui est similaire à celle de la méthode EXSY standard (Les courbes grisées correspondent à une corrélation non prise en compte dans l'ajustement, soit en raison d'une superposition de signaux, soit à cause de la présence d'artefacts). Globalement, la qualité des données pour chaque approche permet d'extraire des valeurs de constantes de vitesse d'échange très proches.



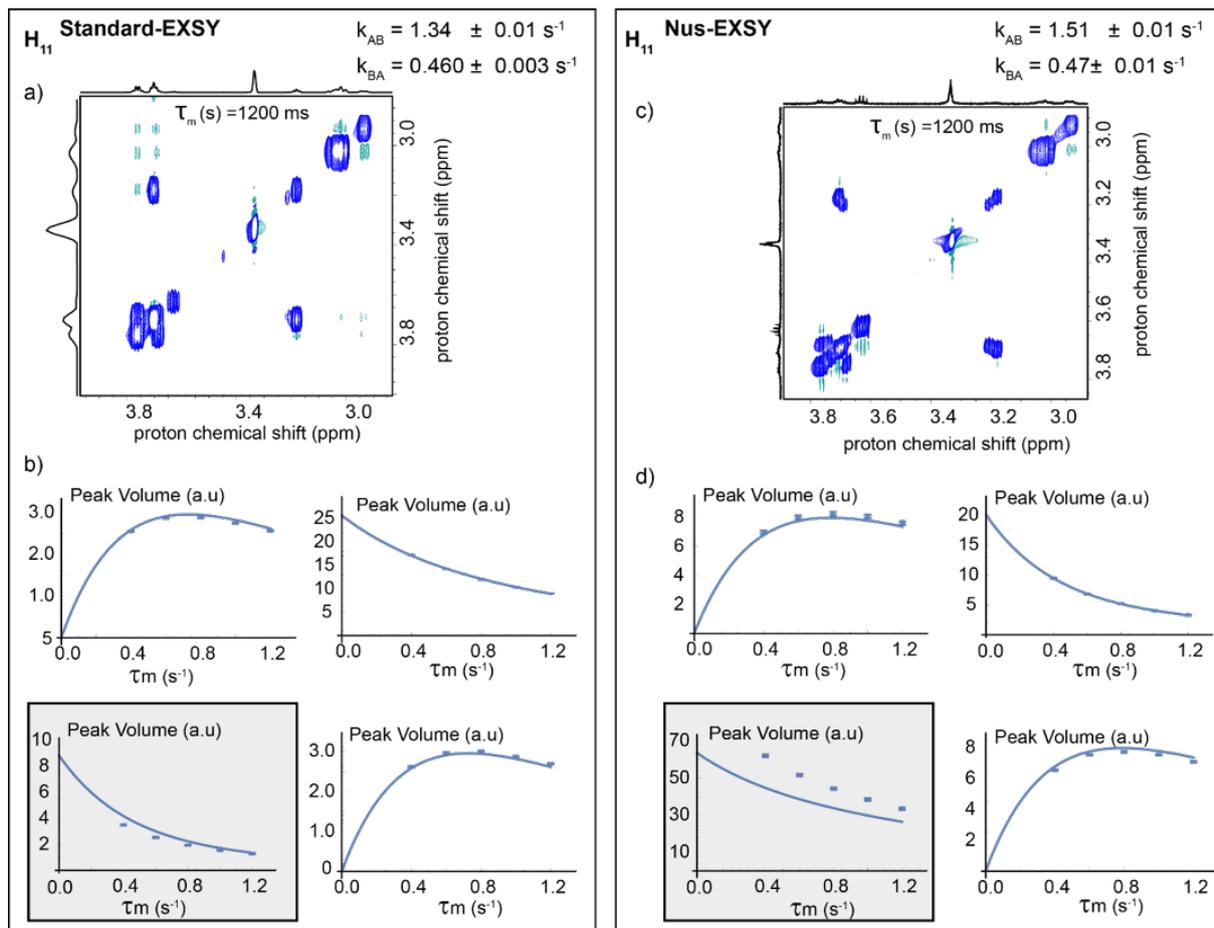
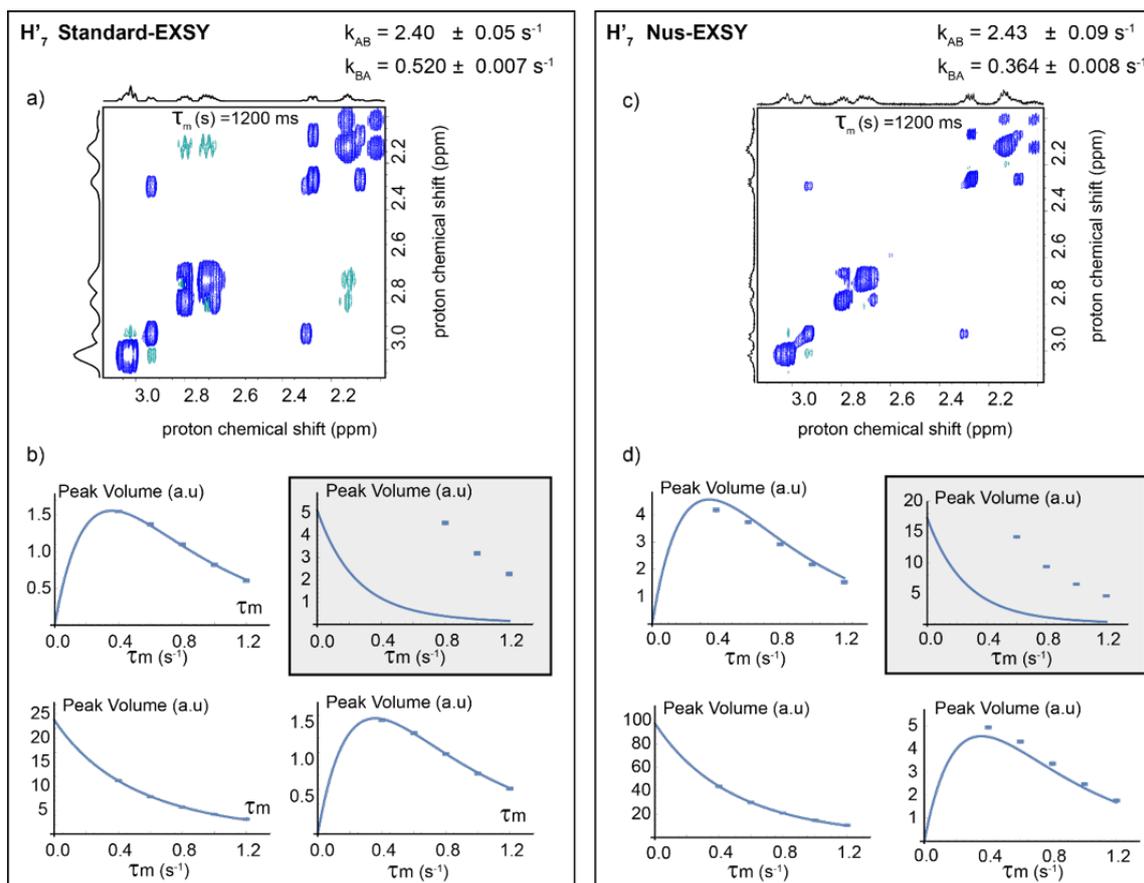
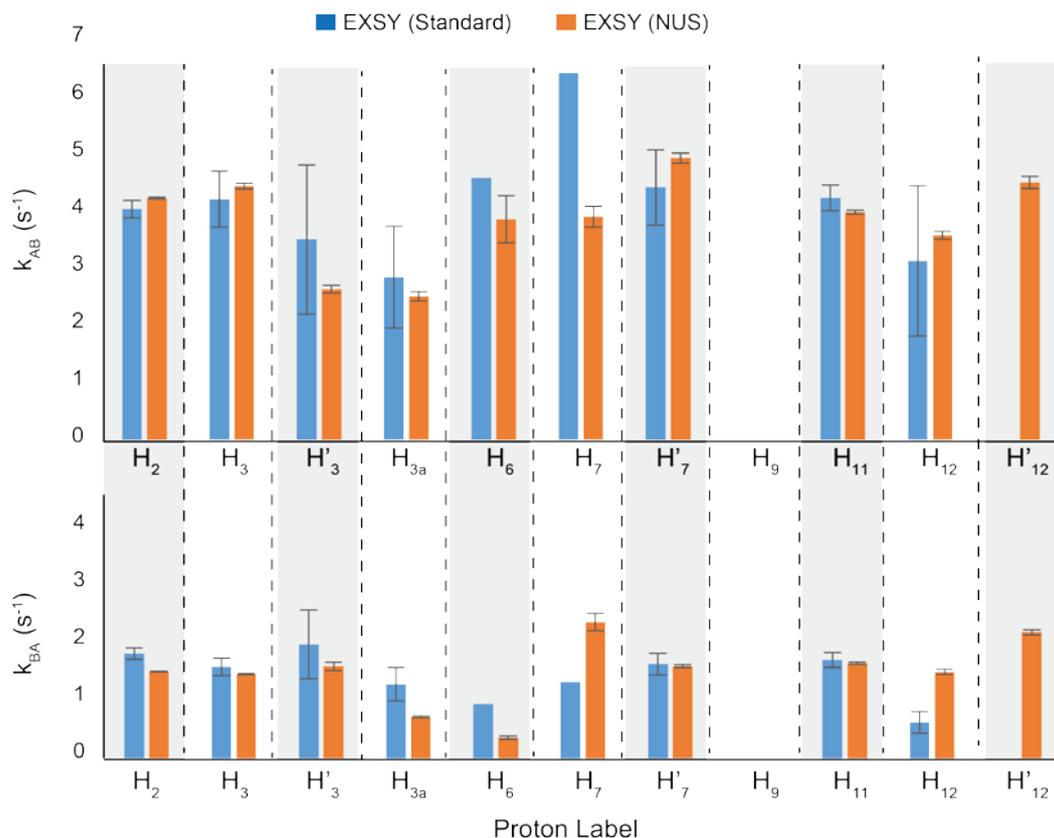


Figure 37. Région sélectionnée des spectres 2D EXSY standard et EXSY avec NUS pour le système de spin  $\text{H}^{11}$ . Courbes d'évolution des corrélations d'échange en fonction du temps de mélange  $\tau_m$  ( $T=300 \text{ K}$ ).



**Figure 38. Région sélectionnée des spectres 2D EXSY standard et EXSY avec NUS pour le système de spin H<sup>7</sup>. Courbes d'évolution des corrélations d'échange en fonction du temps de mélange  $\tau_m$ .**

La figure 39 présente la distribution de valeurs de  $k_{AB}$ , et  $k_{BA}$  qui ont été déterminés pour les différents sites protons du Trandolapril. A la température de 300 K, on observe que les fluctuations des constantes de vitesse le long de la molécule sont similaires, ce qui suggère que les spectres EXSY acquis avec échantillonnage non uniforme sont cohérents de ceux acquis avec un échantillonnage uniforme.



**Figure 39. Diagrammes des vitesses d'échange  $k_{AB}$  et  $k_{BA}$  extraits pour les différents sites de protons du Trandolapril à 300 K. Les barres d'erreur correspondent à deux fois l'écart type des distributions générées par une analyse d'erreur basée sur Monte Carlo.**

Il faut noter ici que l'utilisation d'une méthode d'échantillonnage non uniforme peut être problématique pour les spectres de corrélation de type TOCSY ou NOESY, dans lesquels un grand nombre de corrélations sont attendus, ce qui constitue à priori une limite pour la capacité des algorithmes actuels de reconstruction à générer les bons signaux sans artefacts.

Plus globalement, nous avons observé que pour chaque système de spin les valeurs de vitesse d'échange sont similaires dans les deux jeux de données, à l'exception de quelques protons à 290 K et à 280 K : à cette dernière température nous observons beaucoup d'artefacts, comme illustré par la figure 40.

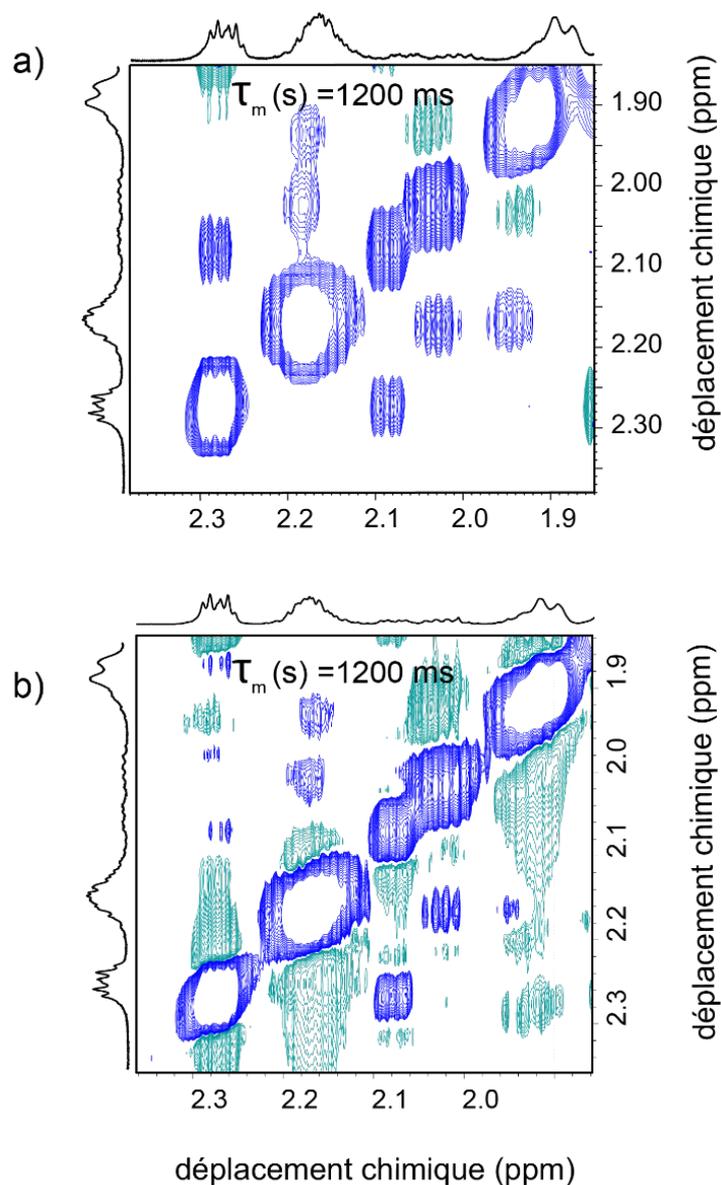
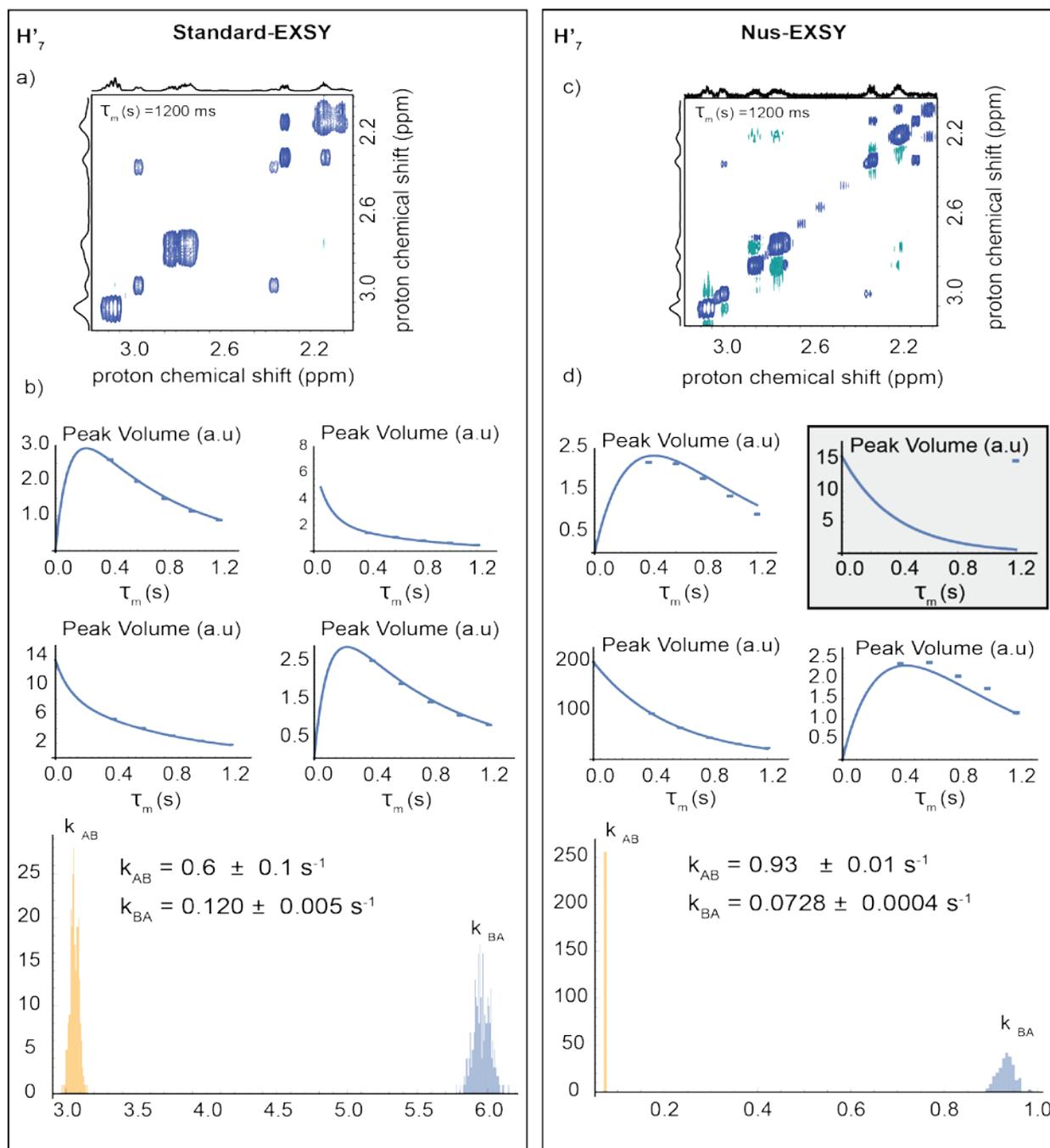


Figure 40. Région sélectionnée des spectres EXSY avec un taux de NUS de 25% enregistrés en respectivement 1h 32 min ( $NS=2$ ,  $\tau_m=1.2s$ ) et 52 min ( $NS=4$ ,  $\tau_m=1.2s$ ), à 280 K.

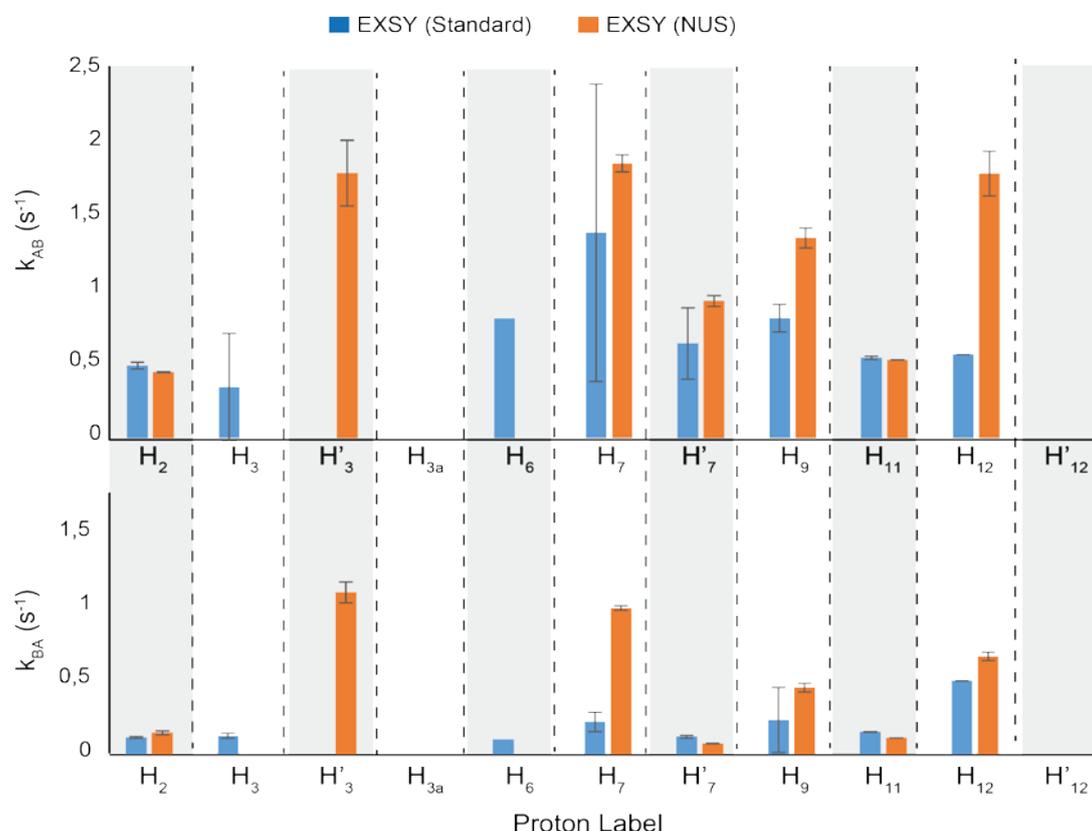
La figure 41 montre la qualité de l'analyse qui a été effectuée pour le site  $H^7$ . Nous observons des différences entre les valeurs de  $k_{AB}$  et  $k_{BA}$  déterminées par les deux approches EXSY standard et EXSY NUS, qui sont dues au fait qu'un nombre réduit de corrélations ont été résolu à cause d'un plus grand nombre d'artefacts pour l'approche NUS.



**Figure 41.** Région sélectionnée des spectres EXSY et EXSY avec NUS pour le système de spin  $H'^7$  enregistrés à 290 K. Courbes d'évolution en fonction du temps de mélange  $\tau_m$  de 0.4 à 1.2s et et histogrammes de  $k_{AB}$  et  $k_{BA}$  obtenus par simulation de type Monte Carlo pour chaque approche.

La distribution des vitesses d'échange  $k_{AB}$  et  $k_{BA}$  qui ont pu être déterminées pour les différents sites proton du Trandolapril à 290 K est représentée en figure 42. Cette distribution traduit

bien le fait que pour de nombreux protons, la qualité des données acquises par échantillonnage non uniforme à cette température est moins fiable que par un échantillonnage uniforme. (Les détails concernant la qualité de l'analyse de tous ces jeux de données sont résumés en Annexe).



**Figure 42. Diagrammes des vitesses d'échange  $k_{AB}$  et  $k_{BA}$  extraits pour les différents sites de protons du Trandolapril à 290 K. Les barres d'erreur correspondent à deux fois l'écart type des distributions générées par une analyse d'erreur basée sur Monte Carlo.**

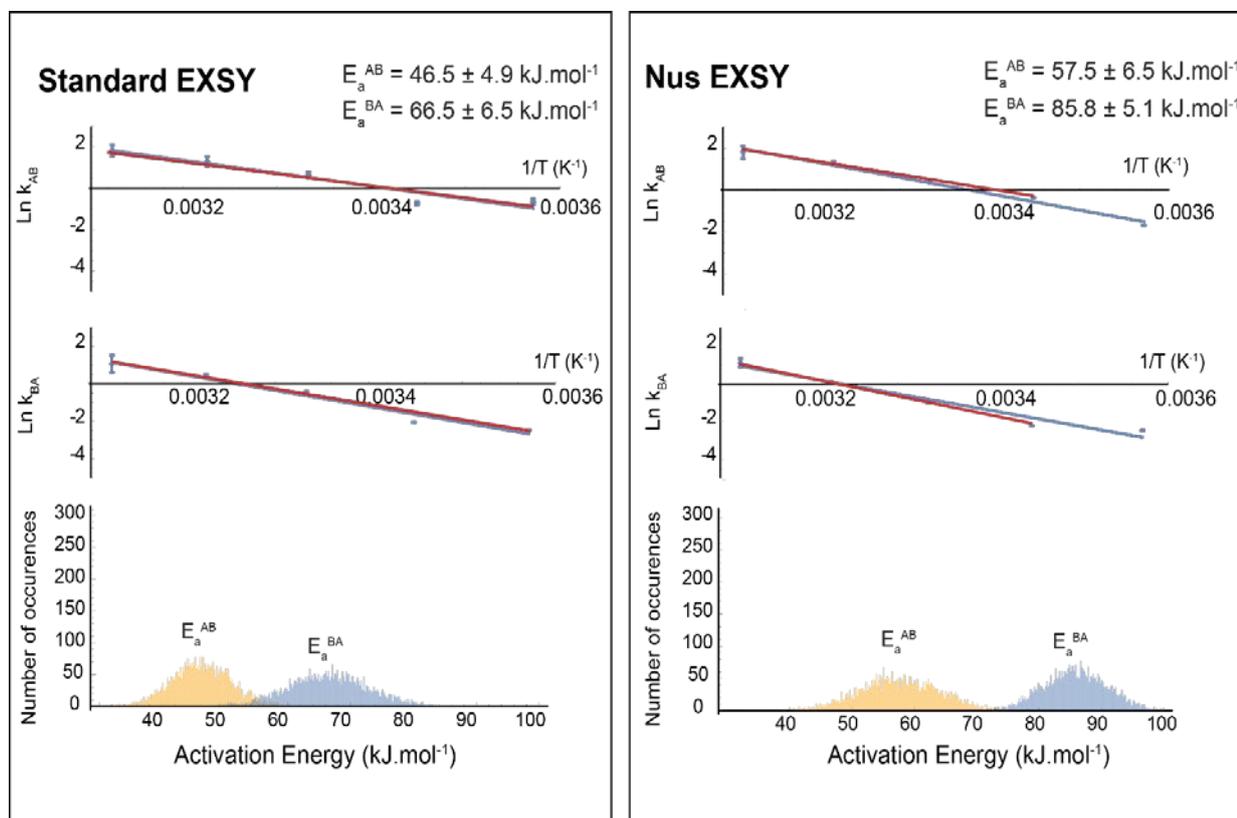
Néanmoins, pour les systèmes de corrélations suffisamment résolus sur les spectres NUS, nous avons pu effectuer une extraction précise des paramètres du processus d'échange. Cela suggère cependant que cette méthode n'est pas totalement fiable à 25% d'échantillonnage non uniforme pour toutes les températures qui ont été évaluées.

### I.A Détermination des énergies d'activation $E_{AB}$ et $E_{BA}$

Nous avons néanmoins déterminé les énergies d'activations de l'échange conformationnel à partir des données acquises avec échantillonnage non uniforme, afin notamment d'étudier la propagation de l'incertitude expérimentale de ces données lors de leur traitement. Pour



cela, nous avons enregistré la série des spectres EXSY NUS à 5 températures différentes de 280 K à 320 K. Pour chaque température, la même analyse que celle décrite précédemment a été mise en oeuvre. La figure 43 montre le résultat de cette analyse.



**Figure 43. (haut) Tracés d'Arrhénius représentant l'évolution de  $\text{Ln}(k_{AB})$  et  $\text{Ln}(k_{BA})$  déterminés en faisant varier la température de l'échantillon, en utilisant les approches EXSY et EXSY avec NUS. (bas) Les histogrammes des énergies d'activation  $E_{AB}$  et  $E_{BA}$  qui ont été obtenus par une analyse d'erreur basée sur la méthode de Monte Carlo.**

Pour les données « EXSY NUS », nous avons rejeté le point à 280 K car la qualité des données était médiocre à 25% NUS. Les écart-type des distributions obtenues pour chaque approche est comparable. De plus, nous remarquons que les valeurs moyennes des distributions générées par l'approche standard et NUS sont légèrement différentes, et que la différence d'énergie  $E_{AB} - E_{BA}$  est de l'ordre de  $25 \text{ kJ.mol}^{-1}$  pour chaque approche. Ces résultats suggèrent que l'utilisation de la méthode NUS pour accélérer l'acquisition de données EXSY sous découplage homonucléaire doit encore être étudiée, avant de présenter la robustesse requise pour ce type d'étude, notamment en regard des variations de températures qui peuvent notamment conduire à des

modifications de la dynamique de l'échange -et donc du spectre- susceptibles de poser un problème pour l'approche NUS. D'autres essais, notamment avec des taux de NUS différents, seront mis en oeuvre dans le futur, pour mieux appréhender le potentiel de cette technique.



---

## CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

---

Durant cette thèse, nous avons effectué plusieurs développements méthodologiques pour améliorer la qualité des spectres RMN 2D de type EXSY afin de les appliquer à l'étude d'un composé pharmaceutique dont la résolution spectrale est un challenge pour les méthodes classiques. Nous nous sommes servis du Trandolapril, un inhibiteur de l'enzyme de conversion de l'angiotensine, comme système modèle pour explorer l'échange conformationnel présent dans cette molécule.

Nous avons d'abord effectué une étude bibliographique qui nous a permis d'identifier la famille d'expériences dites « pure shift » comme outils potentiels pour améliorer la résolution des spectres RMN du Trandolapril. Ensuite, une étude spectroscopique préliminaire nous a permis de définir les conditions de notre étude, en confirmant notamment l'existence d'un régime d'échange lent entre deux conformères déjà décrits dans la littérature. Nous avons également pu mettre en place les différentes méthodes de découplage homonucléaire étudiées dans cette thèse, et les optimiser sur notre échantillon. Ces premiers résultats nous ont permis de démontrer qu'une approche « pure shift » était possible pour analyser cet échantillon dans le régime d'échange lent présent, et d'effectuer l'attribution de la majorité du spectre RMN. Nous avons notamment pu identifier une forme minoritaire invisible sur les spectres standards en raison de la complexité des massifs. L'identification structurale de cette espèce nécessitera d'autres expériences complémentaires.

Nous avons ensuite implémenté et évalués les méthodes Zangger-Sterk (ZS) et PSYCHE dans l'expérience EXSY, afin d'obtenir des cartes d'ultra-haute-résolution susceptibles d'éclairer l'analyse de l'échange entre les deux formes S-cis/S-trans du Trandolapril. Les différentes séquences développées ont permis d'obtenir des gains de résolution significatifs par rapport à l'approche EXSY « classique », cependant au détriment d'un temps d'analyse qui est rallongé pour permettre l'acquisition d'un nombre de points plus élevés, ce qui est la condition pour mesurer des signaux mieux résolus et donc plus fins. Nous avons également montré que le gain de résolution est similaire si le découplage homonucléaire est effectué dans la dimension « directe » ou « indirecte » du spectre final. Nous avons sélectionné une séquence inspirée du travail du groupe de C. Thiele, dans laquelle nous avons implémenté la méthode PSYCHE, pour faire une analyse complète de l'échange en fonction de la température de l'échantillon.

Nous avons également développé un protocole d'analyse pour ajuster les données expérimentales à un modèle d'échange à deux sites. Nous avons également incorporé dans le programme d'extraction des paramètres cinétiques de l'échange conformationnel une analyse d'erreur qui nous a permis d'évaluer la qualité des données, et notamment l'impact de la

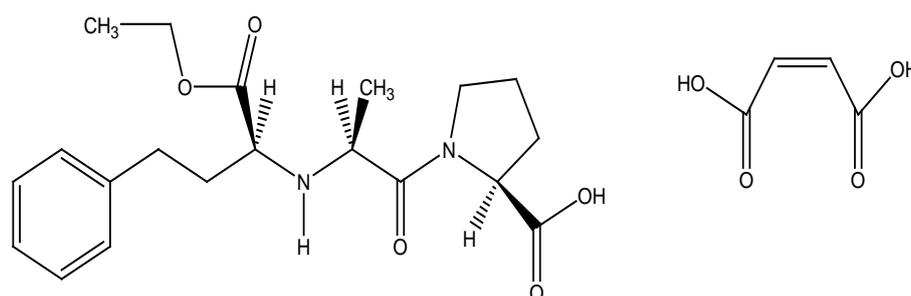


propagation de l'erreur expérimentale à travers le processus d'analyse. Nous observons globalement que les constantes de vitesse, et les barrières d'énergie d'activation déterminées sur des spectres acquis sous découplage homonucléaire sont aussi précises et fiables, et donnent de surcroît accès à un plus grand nombre de sites mieux résolus qui sont inaccessibles pour les méthodes classiques.

Enfin, nous avons évalué la possibilité d'incorporer dans nos expériences une stratégie d'échantillonnage non uniforme du signal (NUS), afin de raccourcir les temps d'analyse. Les résultats préliminaires que nous avons obtenus sont encourageants, mais l'altération des données observée à certaines températures suggère qu'une étude plus approfondie sera nécessaire pour évaluer précisément la robustesse de cette approche.

Il convient de noter que la caractérisation des conformères du Trandolapril par spectroscopie RMN nous a permis de confirmer que l'isomère *s-cis* est plus stable que l'isomère *S-trans*, et qui confirme l'intérêt des méthodes développées. Ces résultats ouvrent donc la voie à une analyse rigoureuse du processus d'échange basée sur une comparaison entre les données EXSY à ultra haute résolution et les valeurs d'énergie déterminées par un calcul théorique des molécules modélisées dans le solvant souhaité <sup>22</sup>. Ils démontrent également la robustesse de l'expérience EXSY PSYCHE, en ce qui concerne les variations de température : en effet, la performance du bloc de découplage homonucléaire reste acceptable à l'échelle de temps du processus d'échange.

Une perspective directe des résultats de cette thèse est l'étude des autres composés de la même famille thérapeutique que le Trandolapril, tels que le maleate d'énalapril (Figure 44).



**Figure 44. Structure du maleate d'énalapril**

Les spectres RMN préliminaires enregistrés sur ce deuxième composé sont disponibles en Annexe. Il sera notamment intéressant d'utiliser les méthodes développées pour caractériser l'évolution du processus d'interconversion en fonction de paramètres physico-



chimiques tels que le pH, ou le solvant.

Par ailleurs, nous notons que différentes améliorations peuvent être apportées en ce qui concerne la mise en œuvre de méthodes « pure shift » dans les expériences EXSY. D'une part, un certain nombre de développements intéressants fondés soit sur la méthode PSYCHE, soit sur la méthode Zangger-Sterk ont été introduits récemment pour éliminer les artefacts<sup>94-95</sup> des données du pur shift et notamment surmonter le problème général des protons fortement couplés<sup>76</sup>. Chaque approche permettant d'acquérir des spectres EXSY ultra-haute résolution dans un délai raisonnable pourrait être développée à l'avenir. D'autre part, l'amélioration de la résolution atteinte ouvre la voie à une modélisation plus précise de l'évolution des pics observés, y compris les échanges chimiques et les transferts de nOe. En effet, puisqu'un nombre plus élevé de corrélations résolues est disponible, il devient possible d'utiliser des modèles de relaxation plus sophistiqués pour ajuster les données. L'élaboration d'un protocole analytique permettant de répondre de manière fiable à cette question est actuellement en cours de développement dans notre groupe.

---

94 S. Tassoti, P. Novak, C. P. Butts, K. Zangger. **2018**, *19*, 3166-3170.

95 P. Moutzouri, Y. Chen, M. Foroozandeh, P. Kiraly, A. R. Phillips, S. R. Coombes, M. Nilsson, G. A. Morris *Chemical Communications*. **2017**, *53*, 10188-10191.



---

## REFERENCES

---

- [1] N. T. Nguyen, R. W. Sieglar *Journal of Chromatography A*. **1996**, 735, 123-150.
- [2] J. L. Cracowski, P. Boutouyrie in *Chapitre 1 - Inhibiteurs du système rénine-angiotensine, Vol.* (Eds.: S. F. d. P. e. d. Thérapeutique, C. N. d. P. Médicale), Elsevier Masson, Paris, **2016**, pp.3-10.
- [3] J.-P. Ducroix, S. Outurquin, B. Benabes-Jezraoui, V. Gras, G. Chaby, V. Strunski, V. Salle, A. Smail, C. Lok, M. Andréjak *La Revue de médecine interne / fondée ... par la Société nationale française de médecine interne*. **2004**, 25, 501-506.
- [4] M. Remko *Chemical Papers*. **2007**, 61, 133-141.
- [5] S. H. Kubo, R. J. Cody *Clinical pharmacokinetics*. **1985**, 10, 377-391.
- [6] J. C. Song, C. M. White *Clinical pharmacokinetics*. **2002**, 41, 207-224.
- [7] G. Sacco, B. Mario, G. Lopez, S. Evangelista, S. Manzini, C. A. Maggi *Vascular Pharmacology*. **2009**, 50, 166-170.
- [8] A. Mimran *Revue De Medecine Interne - REV MED INTERNE*. **2007**, 28.
- [9] A. J. George, W. G. Thomas, R. D. Hannan *Nature Reviews Cancer*. **2010**, 10, 745-759.
- [10] G. Verhoest, T. Dolley-Hitze, F. Jouan, K. Bensalah, Y. Arlot-Bonnemains, F. Dugay, M. A. Belaud-Rotureau, N. Rioux-Leclercq, C. Vigneau *Progrès en Urologie*. **2014**, 24, 73-79.
- [11] C. Zhang, S. Wu, D. Xu *The Journal of Physical Chemistry B*. **2013**, 117, 6635-6645.
- [12] D. M. R. C. Dos Santos, C. B. de Souza, H. J. V. Pereira *Toxicon: Official Journal of the International Society on Toxinology*. **2017**, 131, 63-67.
- [13] S. H. Ferreira, D. C. Bartelt, L. J. Greene *Biochemistry*. **1970**, 9, 2583-2593.
- [14] M. A. Ondetti, D. W. Cushman *Journal of Medicinal Chemistry*. **1981**, 24, 355-361.
- [15] P. J. Rudzki, K. Buś, H. Ksycińska, K. Kobylńska *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*. **2007**, 44, 356-367.
- [16] A. Wzgarda, R. Kleszcz, M. Prokop, K. Regulska, M. Regulski, J. Paluszczak, B. J. Stanisiz *European journal of pharmacology*. **2017**, 797, 9-19.
- [17] M. Bala, M. A. P. Qadar, D. K. Bhardwaj, S. Pasha *Bioorganic & medicinal chemistry*. **2002**, 10, 3685-3691.
- [18] D. R. P. Guay *Clinical Therapeutics*. **2003**, 25, 713-775.
- [19] S. Li, J. Jin-Liang, Y. Yi-Hua, Y.-B. Wu, S. Xiu-Yan, G. Qian-Qun *Chemical Journal of Chinese Universities -Chinese Edition-*. **2012**, 33, 153-157.
- [20] I. R. Kleckner, M. P. Foster *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*. **2011**, 1814, 942-968.
- [21] K. G. Orrell in *Two-Dimensional Methods of Monitoring Exchange, Vol.*, John Wiley & Sons, Ltd, **2007**.
- [22] C. L. Perrin, T. J. Dwyer *Chemical Reviews*. **1990**, 90, 935-967.
- [23] J. J.-L. SHEN Li, YU Yi-Hua, WU Yan-Bo, SUN Xiu-Yan, GU Qian-Qun *Chemical Journal of Chinese Universities*. **2012**, 33, 153-157.



- [24] D. F. Mierke, T. Yamazaki, O. E. Said-Nejad, E. R. Felder, M. Goodman *Journal of the American Chemical Society*. **1989**, *111*, 6847-6849.
- [25] R. O. Fox, P. A. Evans, C. M. Dobson *Nature*. **1986**, *320*, 192-194.
- [26] J. F. Brandts, H. R. Halvorson, M. Brennan *Biochemistry*. **1975**, *14*, 4953-4963.
- [27] W. R. Melander, J. Jacobson, C. Horváth *Journal of Chromatography A*. **1982**, *234*, 269-276.
- [28] A. Kálmán, F. Thunecke, R. Schmidt, P. W. Schiller, C. Horváth *Journal of Chromatography A*. **1996**, *729*, 155-171.
- [29] D. E. Henderson, C. Horváth *Journal of Chromatography A*. **1986**, *368*, 203-213.
- [30] F. Thunecke, A. Kálmán, F. Kálmán, S. Ma, A. S. Rathore, C. Horváth *Journal of Chromatography A*. **1996**, *744*, 259-272.
- [31] W. R. Melander, H. J. Lin, J. Jacobson, C. Horvath *The Journal of Physical Chemistry*. **1984**, *88*, 4527-4536.
- [32] A. Wuttea, G. Gübitz, S. Friebeb, G. J. Krauss *Journal of Chromatography A*. **1994**, *677*, 186-191.
- [33] S. Bouabdallah, H. Trabelsi, K. Bouzouita, S. Sabbah *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*. **2002**, *54*, 391-405.
- [34] S. Bouabdallah, H. Trabelsi, T. Ben Dhia, S. Sabbah, K. Bouzouita, R. Khaddar *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. **2003**, *31*, 731-741.
- [35] E. M. Purcell, H. C. Torrey, R. V. Pound *Physical Review*. **1946**, *69*, 37-38.
- [36] J. Courtieu, N. Giraud, O. Lafon, P. Lesot, C. Lorthioir, J.-M. Nuzillard *ChemInform*. **2013**, *44*, no-no.
- [37] D. Canet, Introduction: General Theory of Nuclear Relaxation, **2005**.
- [38] F. Bloch *Physical Review*. **1946**, *70*, 460-474.
- [39] N. Bloembergen, E. M. Purcell, R. V. Pound *Physical Review*. **1948**, *73*, 679-712.
- [40] J. Jeener, B. Meier, P. Bachmann, R. R. J. Ernst *The Journal of Chemical Physics*. **1979**, *71*, 4546-4553.
- [41] M. D. Arnesen-Trunzo *Open Journal of Social Sciences*. **2015**, *03*, 50-56.
- [42] W. P. Aue, E. Bartholdi, R. R. Ernst *The Journal of Chemical Physics*. **1976**, *64*, 2229-2246.
- [43] J. W. Emsley, J. Feeney, L. H. Sutcliffe, *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy*, Elsevier, **2013**.
- [44] in *Annual Reports on NMR Spectroscopy* | Vol 27, Pages iii-vii, 1-368 (1993) | ScienceDirect.com, Vol. (Ed.^Eds.: Editor), City, **2018**.
- [45] A. G. Palmer, C. D. Kroenke, J. Patrick Loria in [10] - *Nuclear Magnetic Resonance Methods for Quantifying Microsecond-to-Millisecond Motions in Biological Macromolecules*, Vol. 339 (Eds.: T. L. James, V. Dötsch, U. Schmitz), Academic Press, **2001**, pp.204-238.
- [46] G. Ivanova, B. Yakimova, S. Angelova, I. Stoineva, V. Enchev *Journal of Molecular Structure*. **2010**, *975*, 330-334.
- [47] A. A. Isab, M. I. M. Wazeer *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. **2006**, *65*, 191-195.
- [48] C. J. Falzone, P. E. Wright, S. J. Benkovic *Biochemistry*. **1994**, *33*, 439-442.
- [49] J. E. H. Pucheta, D. Prim, J. M. Gillet, J. Farjon *ChemPhysChem*. **2016**, *17*, 1034-1045.
- [50] T. L. Religa, R. Sprangers, L. E. Kay *Science*. **2010**, *328*, 98-102.



- [51] J. Key, T. H. Scheuermann, P. C. Anderson, V. Daggett, K. H. Gardner *Journal of the American Chemical Society*. **2009**, *131*, 17647-17654.
- [52] J.-P. Demers, A. Mittermaier *Journal of the American Chemical Society*. **2009**, *131*, 4355-4367.
- [53] M. Doucleff, G. M. Clore *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **2008**, *105*, 13871-13876.
- [54] Y. Nikolaev, K. Pervushin *Journal of the American Chemical Society*. **2007**, *129*, 6461-6469.
- [55] E. S. Kuloğlu, D. R. McCaslin, J. L. Markley, B. F. Volkman *The Journal of Biological Chemistry*. **2002**, *277*, 17863-17870.
- [56] P. Sarkar, C. Reichman, T. Saleh, R. B. Birge, C. G. Kalodimos *Molecular cell*. **2007**, *25*, 413-426.
- [57] D. D. Boehr, H. J. Dyson, P. E. Wright *Chemical Reviews*. **2006**, *106*, 3055-3079.
- [58] J. S. Fraser, M. W. Clarkson, S. C. Degnan, R. Erion, D. Kern, T. Alber *Nature*. **2009**, *462*, 669-673.
- [59] E. Canet, F. Kateb, T. Segawa, A. Sehgal, G. Bodenhausen, P. Pelupessy *L'Actualité chimique*. **2017**, *416*, 19.
- [60] F. Kateb, P. Pelupessy, G. Bodenhausen *Journal of Magnetic Resonance*. **2007**, *184*, 108-113.
- [61] E. Canet, D. Mammoli, P. Kadeřávek, P. Pelupessy, G. Bodenhausen *Physical Chemistry Chemical Physics*. **2016**, *18*, 10144-10151.
- [62] R. Freeman *Journal of Molecular Structure*. **1992**, *266*, 39-51.
- [63] H. Geen, R. Freeman *Journal of Magnetic Resonance (1969)*. **1991**, *93*, 93-141.
- [64] B. Plainchont, D. Pitoux, G. Hamdoun, J.-M. Ouvrard, D. Merlet, J. Farjon, N. Giraud *Physical Chemistry Chemical Physics*. **2016**, *18*, 31338-31338.
- [65] W. P. Aue, J. Karhan, R. R. Ernst *The Journal of Chemical Physics*. **1976**, *64*, 4226-4227.
- [66] A. J. Pell, J. Keeler *J Magn Reson*. **2007**, *189*, 293-299.
- [67] K. Zangger, H. Sterk *Journal of Magnetic Resonance*. **1997**, *124*, 486-489.
- [68] K. Zangger *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy*. **2015**, *86-87*, 1-20.
- [69] M. Foroozandeh, R. W. Adams, N. J. Meharry, D. Jeannerat, M. Nilsson, G. A. Morris *Angewandte Chemie International Edition*. **2014**, *53*, 6990-6992.
- [70] J.-M. Böhlen, G. Bodenhausen, Experimental Aspects of Chirp NMR Spectroscopy, **1993**.
- [71] D. Pitoux, Z. Hu, B. Plainchont, D. Merlet, J. Farjon, D. Bonnaffé, N. Giraud *Magnetic Resonance in Chemistry*. **2015**, *53*, 836-844.
- [72] J. C. J. Barna, E. D. Laue, M. R. Mayger, J. Skilling, S. J. P. Worrall *Journal of Magnetic Resonance (1969)*. **1987**, *73*, 69-77.
- [73] S. Sibisi, J. Skilling, R. G. Brereton, E. D. Laue, J. Staunton *Nature*. **1984**, *311*, 446-447.
- [74] J. C. J. Barna, S. M. Tan, E. D. Lade *Journal of Magnetic Resonance (1969)*. **1988**, *78*, 327-332.
- [75] K. Kazimierczuk, V. Orekhov *Magnetic Resonance in Chemistry*. **2015**, *53*, 921-926.
- [76] Y. Matsuki, M. T. Eddy, J. Herzfeld *Journal of the American Chemical Society*. **2009**, *131*, 4648-4656.



- [77] K. Kazimierczuk, V. Y. Orekhov *Angewandte Chemie International Edition*. **2011**, *50*, 5556-5559.
- [78] D. J. Holland, M. J. Bostock, L. F. Gladden, D. Nietlispach *Angewandte Chemie International Edition*. **2011**, *50*, 6548-6551.
- [79] V. Tugarinov, L. E. Kay, I. Ibraghimov, V. Y. Orekhov *Journal of the American Chemical Society*. **2005**, *127*, 2767-2775.
- [80] S. Hiller, I. Ibraghimov, G. Wagner, V. Y. Orekhov *Journal of the American Chemical Society*. **2009**, *131*, 12970-12978.
- [81] V. Y. Orekhov, V. A. Jaravine *Prog Nucl Magn Reson Spectrosc*. **2011**, *59*, 271-292.
- [82] D. Rovnyak, M. Sarcone, Z. Jiang *Magnetic Resonance in Chemistry*. **2011**, *49*, 483-491.
- [83] M. Foroozandeh, R. W. Adams, N. J. Meharry, D. Jeannerat, M. Nilsson, G. A. Morris *Angewandte Chemie (International Ed. in English)*. **2014**, *53*, 6990-6992.
- [84] M. Foroozandeh, R. W. Adams, M. Nilsson, G. A. Morris *Journal of the American Chemical Society*. **2014**, *136*, 11867-11869.
- [85] in *Ultrahigh Resolution NMR Spectroscopy* - Foroozandeh M. *Angewandte Chemie International Edition - Wiley Online Library*, Vol. (Ed. Eds.: Editor), City.
- [86] N. H. Meyer, K. Zangger *Angewandte Chemie (International ed. in English)*. **2013**, *52*, 7143-7146.
- [87] P. Sakhaii, B. Haase, W. Bermel, R. Kerssebaum, G. E. Wagner, K. Zangger *J Magn Reson*. **2013**, *233*, 92-95.
- [88] J. Mauhart, S. Glanzer, P. Sakhaii, W. Bermel, K. Zangger *Journal of Magnetic Resonance*. **2015**, *259*, 207-215.
- [89] M. G. Concilio, P. Kiraly, G. A. Morris *Journal of Magnetic Resonance*. **2019**, *301*, 85-93.
- [90] J. A. Aguilar, S. Faulkner, M. Nilsson, G. A. Morris *Angew Chem Int Ed Engl*. **2010**, *49*, 3901-3903.
- [91] S. G. Hyberts, H. Arthanari, S. A. Robson, G. Wagner *A special "JMR Perspectives" issue: Foresights in Biomolecular Solution-State NMR Spectroscopy – From Spin Gymnastics to Structure and Dynamics*. **2014**, *241*, 60-73.
- [92] S. G. Hyberts, G. J. Heffron, N. G. Tarragona, K. Solanky, K. A. Edmonds, H. Luithardt, J. Fejzo, M. Chorev, H. Aktas, K. Colson, K. H. Falchuk, J. A. Halperin, G. Wagner *Journal of the American Chemical Society*. **2007**, *129*, 5108-5116.
- [93] R. K. Rai, N. Sinha *Analytical Chemistry*. **2012**, *84*, 10005-10011.
- [94] S. Tassoti, P. Novak, C. P. Butts, K. Zangger. **2018**, *19*, 3166-3170.
- [95] P. Moutzouri, Y. Chen, M. Foroozandeh, P. Kiraly, A. R. Phillips, S. R. Coombes, M. Nilsson, G. A. Morris *Chemical Communications*. **2017**, *53*, 10188-10191.



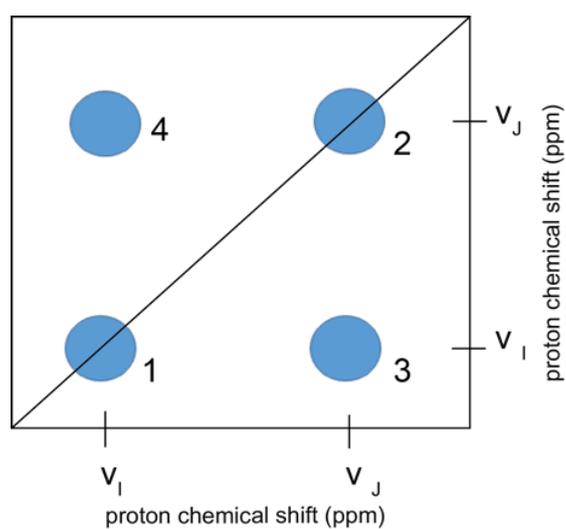
---

## ANNEXES

---

#### IV. Aperçu sur l'analyse des spectres EXSY

Les tableaux ci-dessous présentent les corrélations qui sont incluses dans le protocole d'ajustement pour déterminer les paramètres du modèle d'échange à l'aide des différentes séquences d'impulsions EXSY standard- Psyche et NUS décrites dans le texte principal, pour chaque site de protons. Les corrélations sont étudiées selon le schéma ci-dessous:



<b>T=320 K</b>	<b>EXSY-Standard</b>	<b>EXSY-Psyche</b>	Les sites proton pris en compte dans le calcul de l'EA standard EXSY	Les sites proton pris en compte dans le calcul de l'EA Psyche-EXSY
H2	{1, 3, 4}	{1, 2, 4}	✓	✓
H3	Superposition	{2,3}Superposition		
H'3	{1, 2, 3, 4}	{2,3} Artefacts	✓	✓
H3a	Superposition	{2,3} Artefacts		
H6	{2,3} Superposition	{2, 3, 4} Artefacts	✓	✓
H7	Superposition	{2,3} Résolution		✓
H'7	{2, 3}	{4,1}Superposition	✓	✓
H7a	X Signaux tués par artefacts	X Signaux tués par artefacts	✓	✓
H9	X Signaux tués par artefacts	X Signaux tués par artefacts		
H11	{1, 2, 3, 4}	{2,3}Superposition		
H12	{2,3} Résolution	{1, 3, 4} Artefacts		✓
H'12	X Superposition	{2, 3} Artefacts		✓

<b>T=310 K</b>	<b>EXSY-Standard</b>	<b>EXSY-Psyche</b>	Les sites proton pris en compte dans le calcul de l'EA standard EXSY	Les sites proton pris en compte dans le calcul de l'EA Psyche-EXSY
H2	{1, 3, 4}	{1, 3, 4} Artefacts	✓	✓
H3	{1, 3, 4}	{1,3}Superposition	✓	✓
H'3	{2,3} Superposition	{2,3}Superposition	✓	✓
H3a	{2,3} Superposition	{2,3} Artefacts	✓	✓
H6	{2,3} Superposition	{2,3} Artefacts		✓
H7	{2,3} Résolution	{2, 3}		✓
H'7	{1, 3, 4}	{2, 3}	✓	✓
H7a	X Signaux tués par artefacts	X Signaux tués par artefacts	✓	✓
H9	X Résolution	X Superposition		
H11	{1,2,3}Superposition	{2,3} Résolution		
H12	{2,3} Résolution	{2,3}Superposition	✓	✓
H'12	X Superposition	{2,3} Artefacts		

<b>T=300 K</b>	<b>EXSY-Standard</b>	<b>EXSY-Psyche</b>	Les sites proton pris en compte dans le calcul de l'EA standard EXSY	Les sites proton pris en compte dans le calcul de l'EA Psyche-EXSY
H2	{1, 3, 4} Artefacts	{1, 3} Artefacts	✓	✓
H3	{1, 2, 3, 4}	{1, 2, 3, 4}	✓	✓
H'3	{2,3,4}Superposition	{1, 2, 4} Superposition	✓	
H3a	{1,3} Superposition	{1, 3} Superposition		
H6	{2,3} Superposition	{2, 3} Superposition	✓	✓
H7	{2, 4}	{1,2,3,4}Superposition	✓	✓
H7'	{1, 3, 4}	{1, 3, 4} Artefacts	✓	✓
H7a	X Signaux tués par artefacts	X Signaux tués par artefacts	✓	✓
H9	{1,4} Superposition	{1,3,4}Superposition	✓	✓
H11	{2, 3, 4} Résolution	{3,2} Superposition		
H12	{1,3,4}Superposition	{3,2} Superposition	✓	✓
H'12		{3,2} Superposition		

<b>T=290 K</b>	<b>EXSY-Standard</b>	<b>EXSY-Psyche</b>	Les sites proton pris en compte dans le calcul de l'EA standard EXSY	Les sites proton pris en compte dans le calcul de l'EA Psyche-EXSY
H2	{1, 2, 4}	{1, 3} Artefacts	✓	✓
H3	{1,3,4}Superposition	{2, 3} Superposition	✓	✓
H'3	X	{2, 4} Artefacts		
H3a	X	{2, 3} Artefacts		
H6	{2,3} Résolution	{2, 3} Artefacts		
H7	{1, 2, 4}	{2, 3, 4}Résolution		
H'7	{1, 3, 4}	{1, 4} Superposition	✓	✓
H7a	Signaux tués par artefacts	X Signaux tués par artefacts	✓	✓
H9	{2,3} Résolution	{1, 3, 4} Artefacts		
H11	{1, 2, 3, 4}	{1,2,3,4}Superposition		
H12	{1, 2, 3}	X Artefacts		
H'12	X	X Artefacts		

T=280 K	EXSY-Standard	EXSY-Psyche	Les sites proton pris en compte dans le calcul de l'EA standard EXSY	Les sites proton pris en compte dans le calcul de l'EA Psyche-EXSY
H2	{1,3} Résolution	{1,3} Artefacts	✓	✓
H3	{1, 3, 4} Résolution	{2, 3, 4} Artefacts	✓	✓
H'3	X	X		
H3a	X	X		
H6	X	X		
H7	{1,4} Résolution	X		
H'7	{1, 3,4} Résolution	{1,4} artefacts	✓	✓
H7a	X Signaux tués par artefacts	X Signaux tués par artefacts	✓	✓
H9	X	{1, 2, 4}	✓	✓
H11	{2,3} Résolution	{1,2, 3}		
H12	X	X		
H'12	X	X		

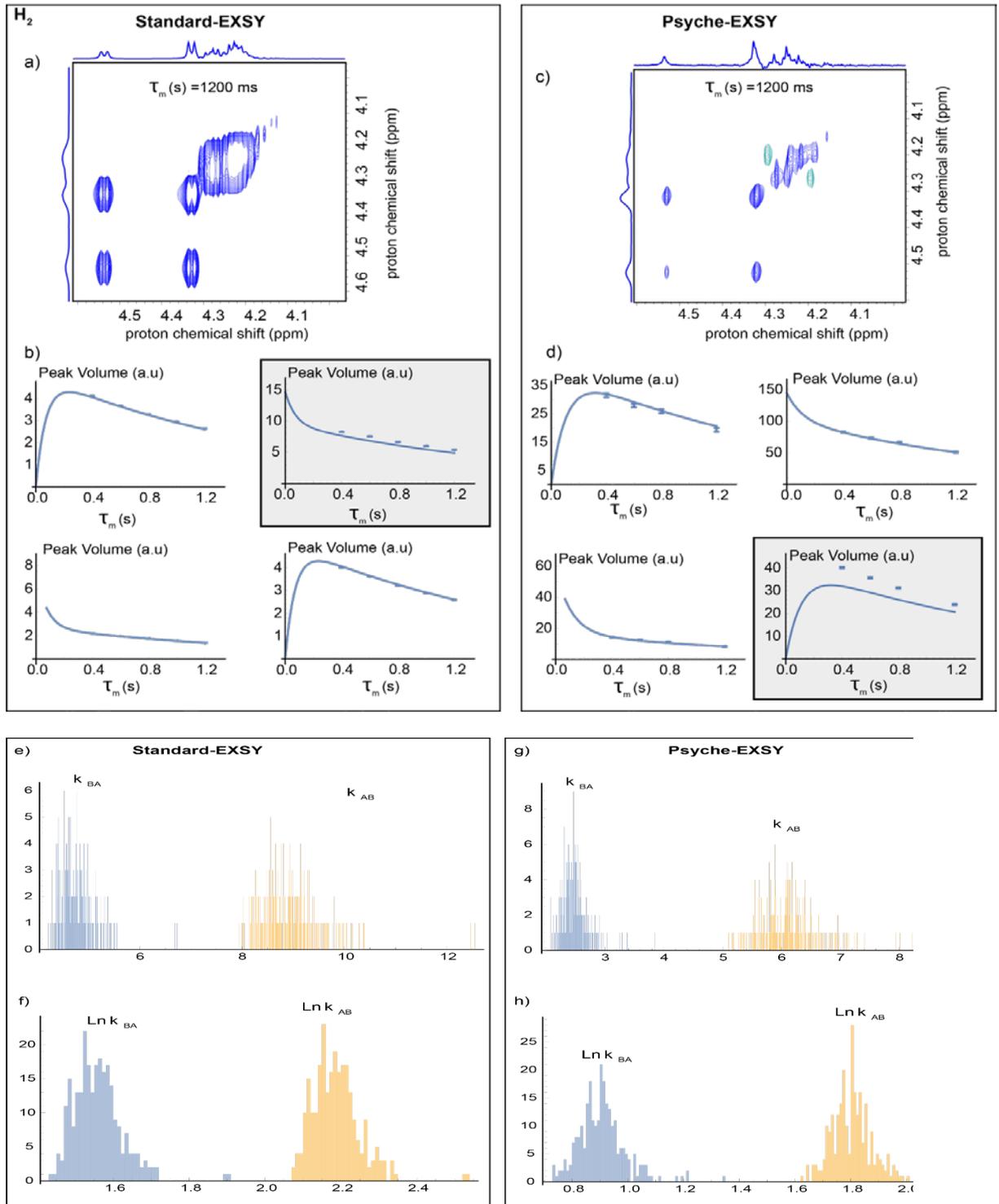
## V. Expériences EXSY (standard-Psyche)

Cette section présente les données expérimentales enregistrées pour chaque site de protons dans le Trandolapril, à différentes températures comprises entre 280 K et 320 K, en utilisant des séquences d'impulsions EXSY standard et EXSY Psyche. Pour chaque proton à une température donnée, une région sélectionnée de spectre 2D EXSY, les courbes d'accumulation obtenues en faisant varier  $\tau_m$  et les histogrammes illustrent la distribution des vitesses d'échange obtenues par la simulation de Monte Carlo sont indiqués ci-dessous. Les barres d'erreur ont été déterminées, pour chaque approche, en simulant 256(1024) ensembles de données générées aléatoirement et avec un écart-type de l'incertitude expérimentale. Chaque jeu de données a été analysé à l'aide du protocole d'ajustement décrit ci-dessus et des valeurs de paramètres correspondant au meilleur ajustement.

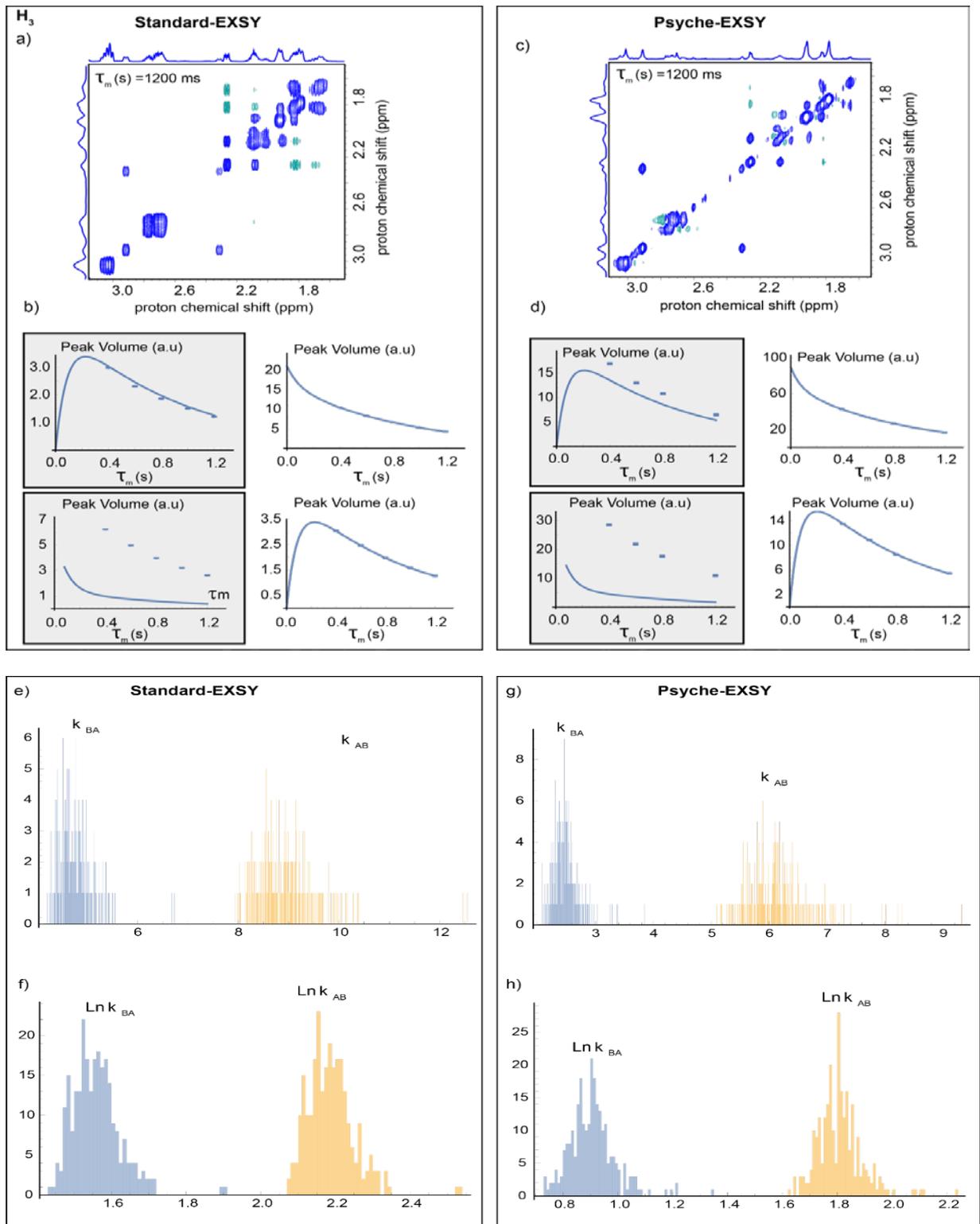


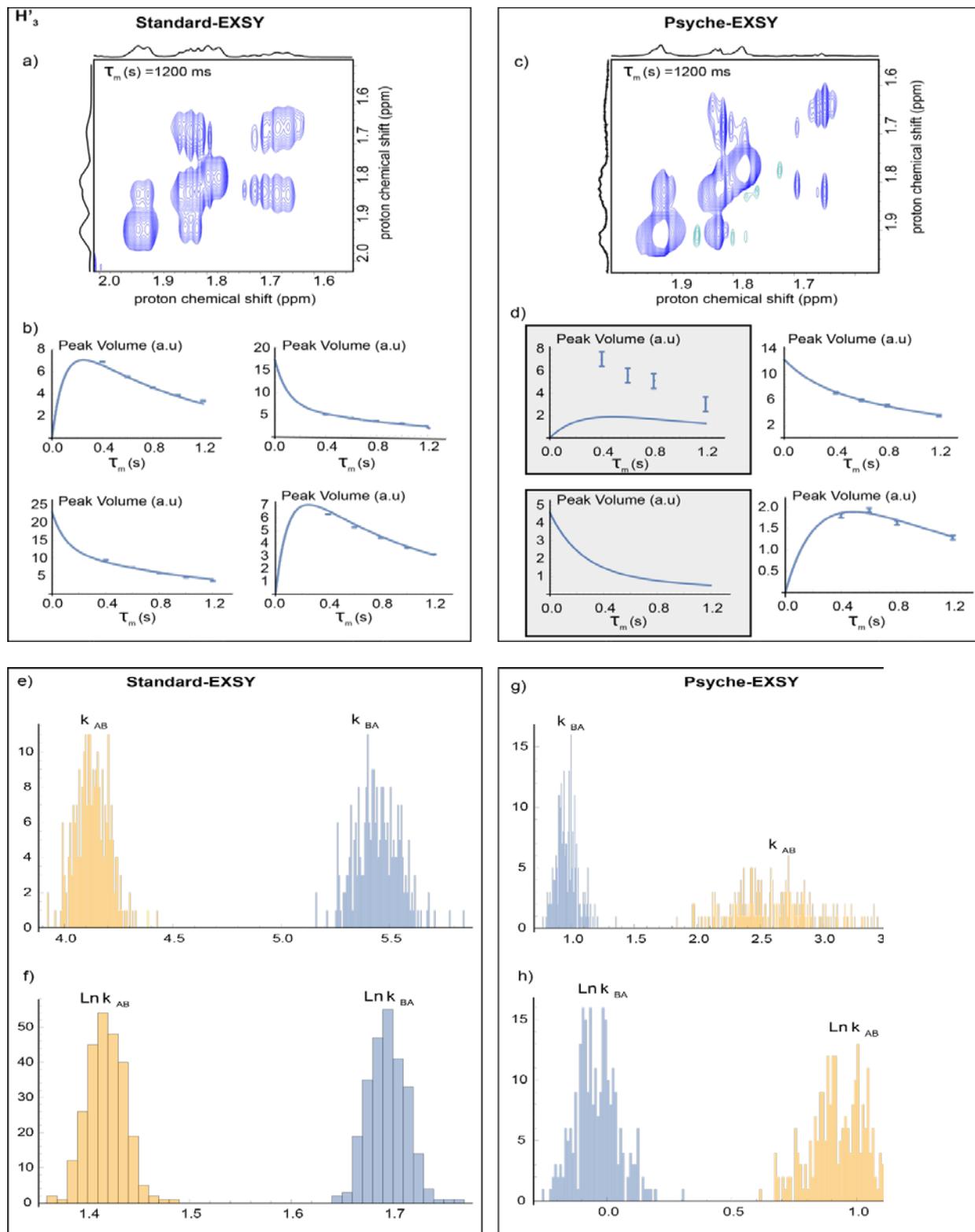


## V.A Spectre EXSY enregistrés à 320 K

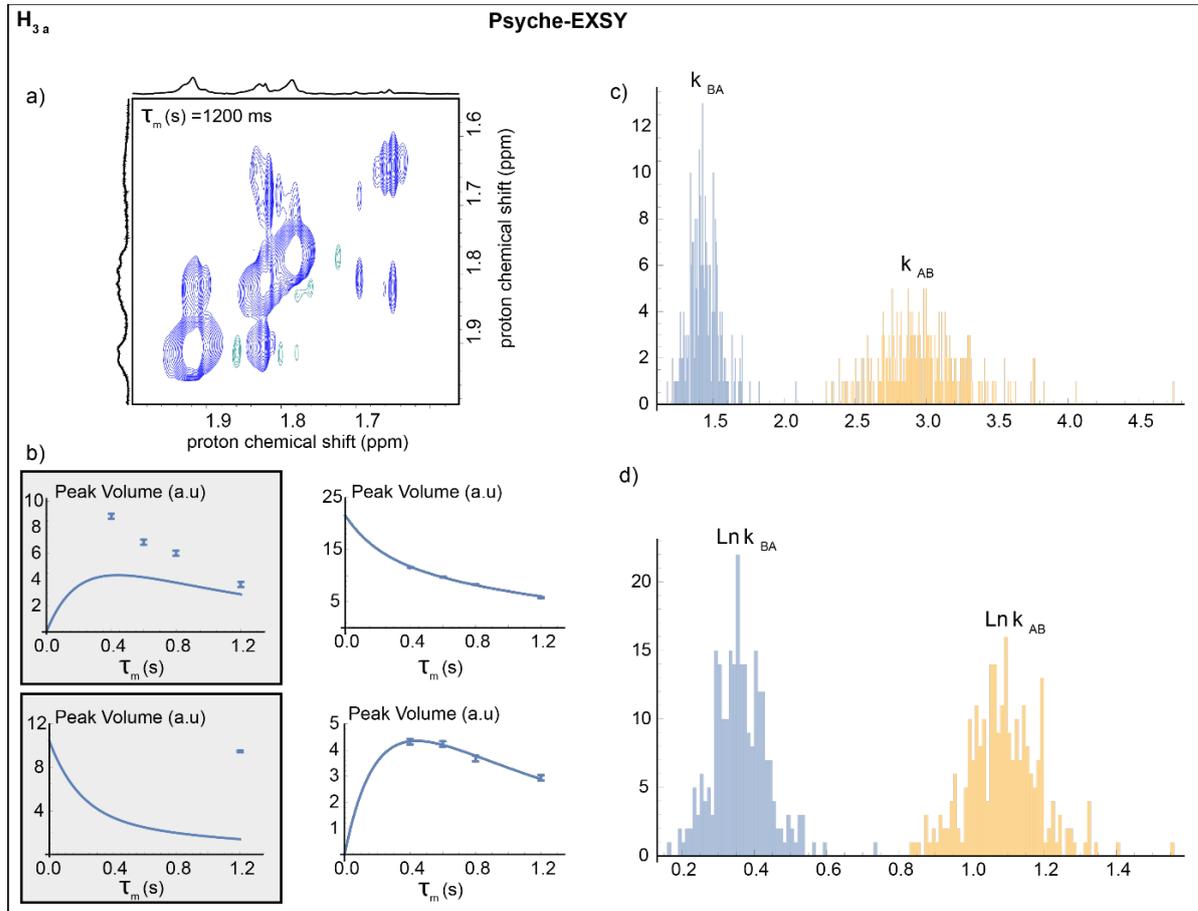
V.A.1  $H_2$ 

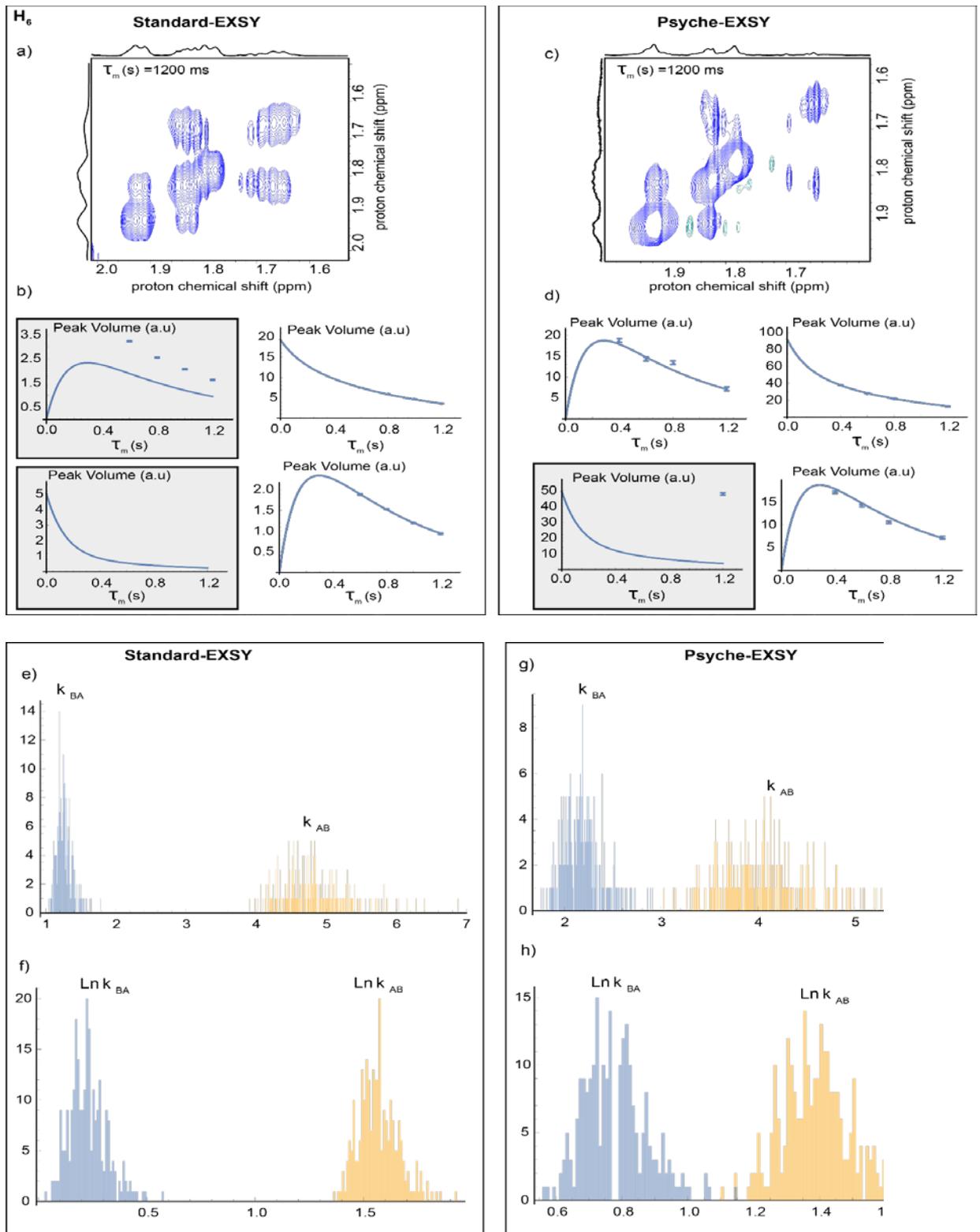


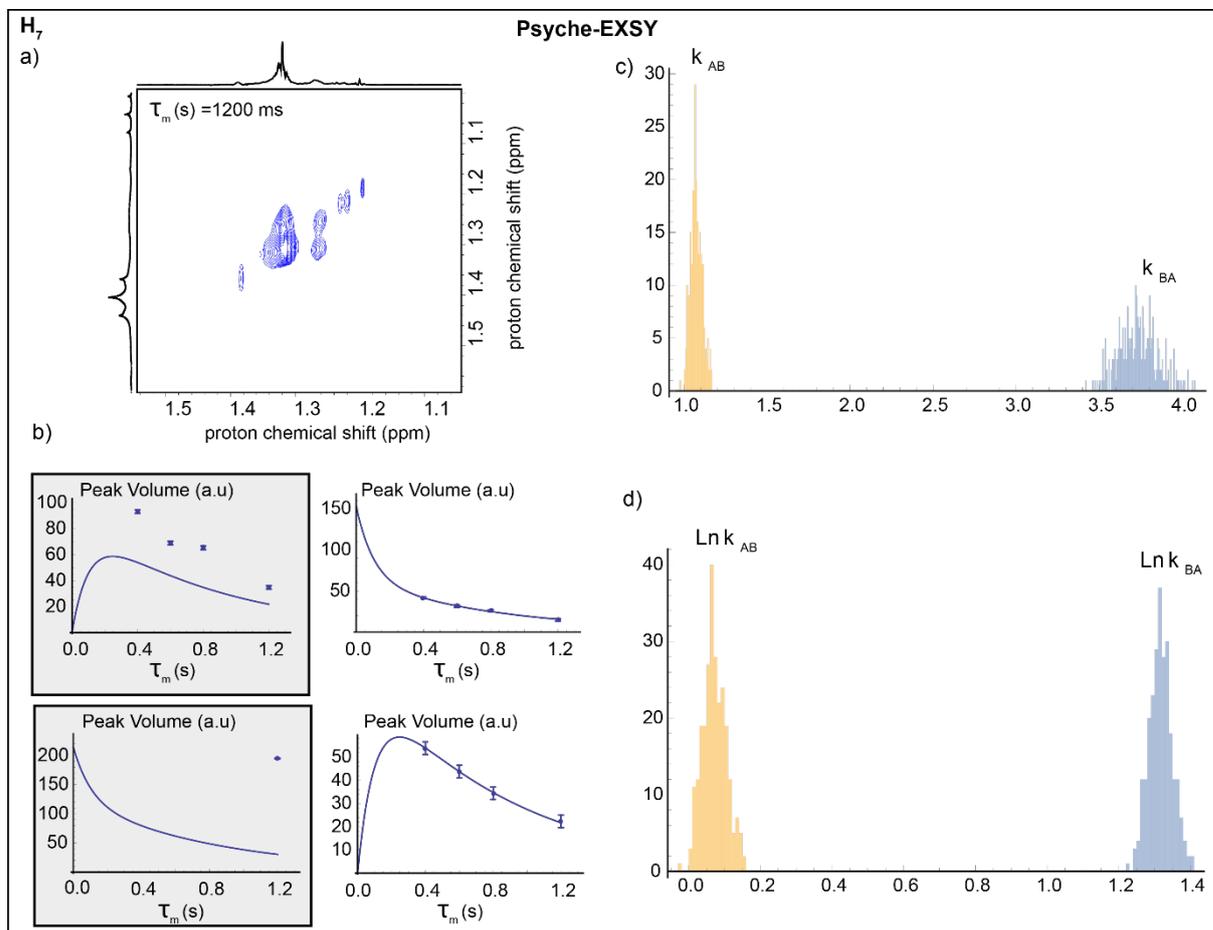
V.A.2  $H_3$ 

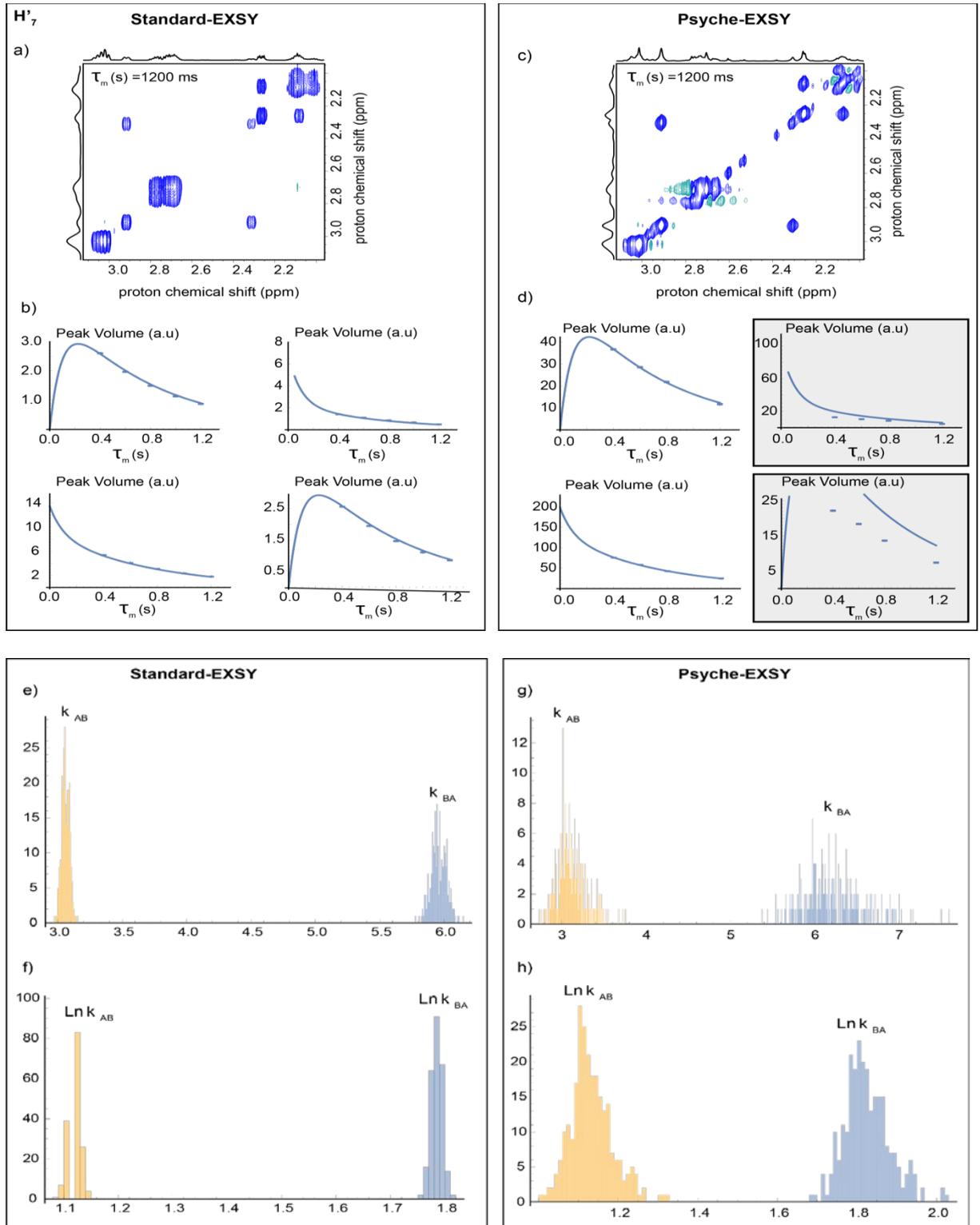
V.A.3  $H'_3$ 

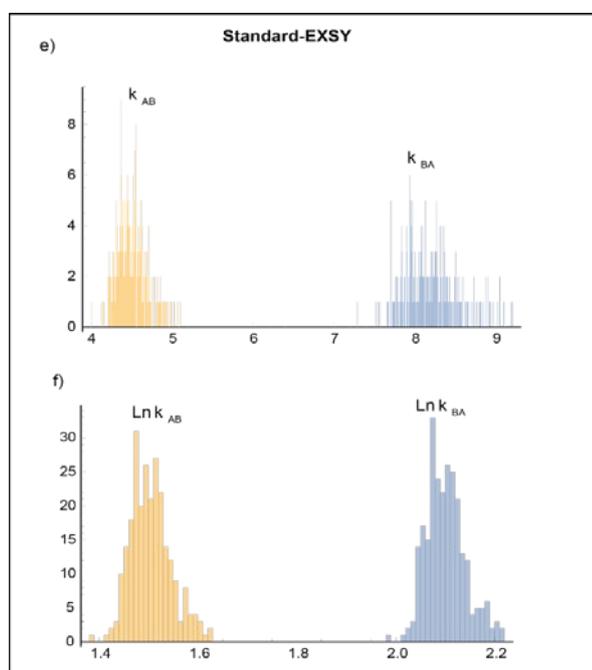
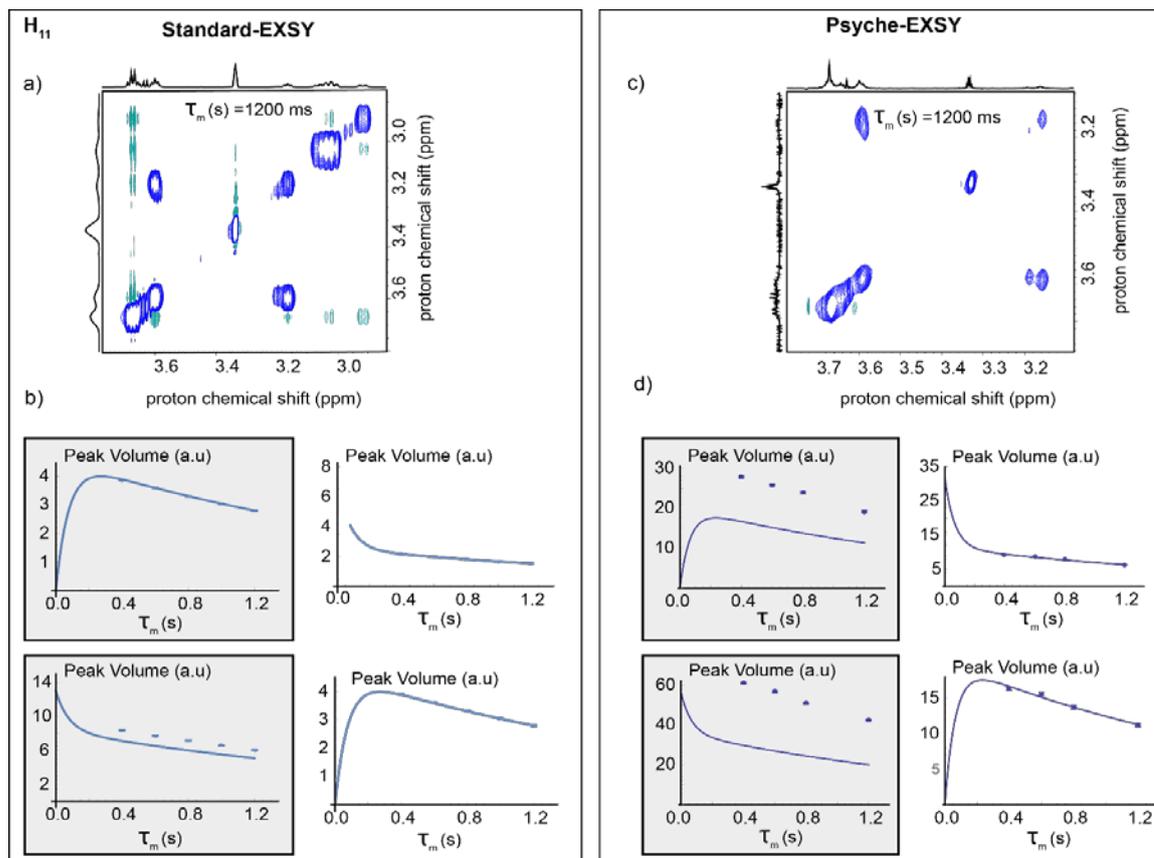


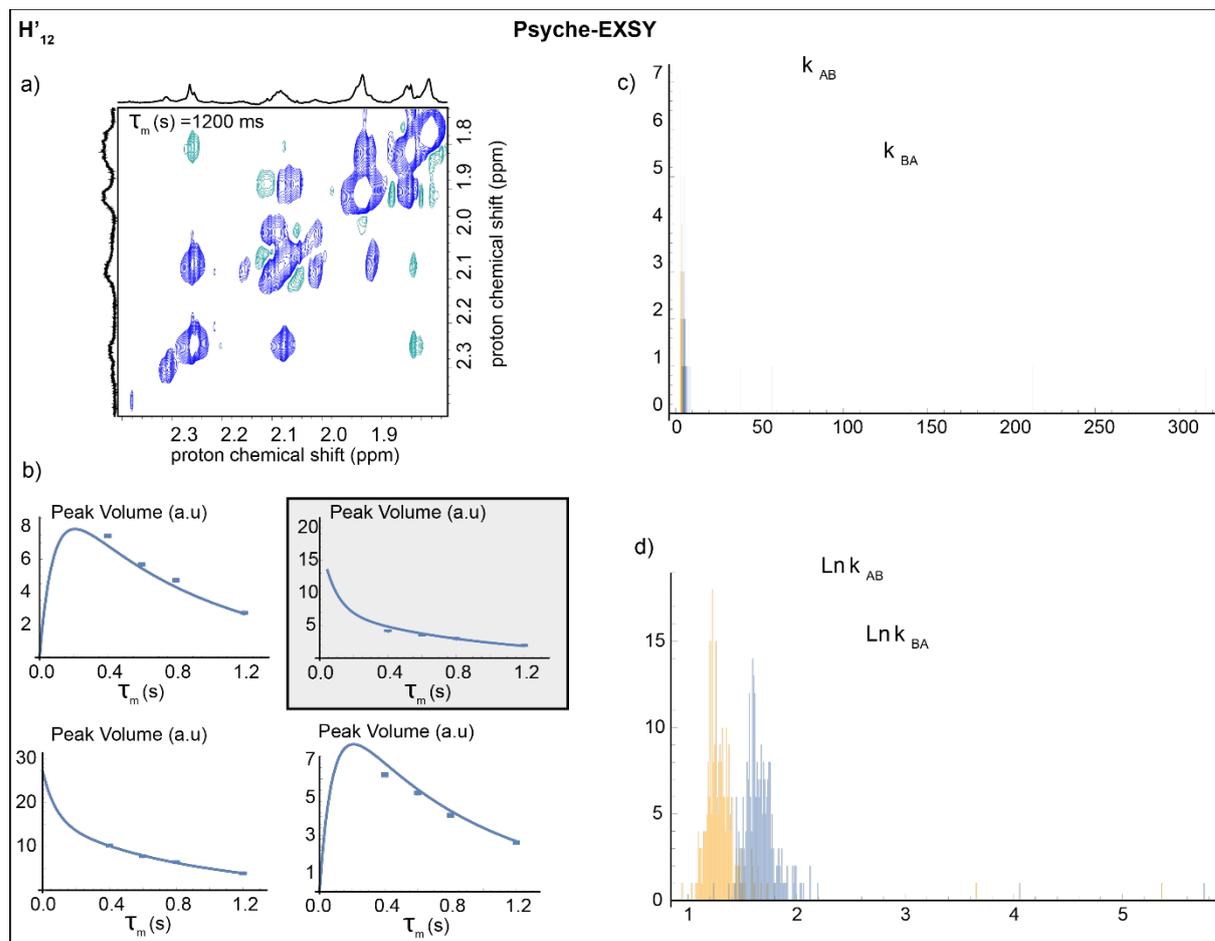
V.A.4  $H_{3a}$ 

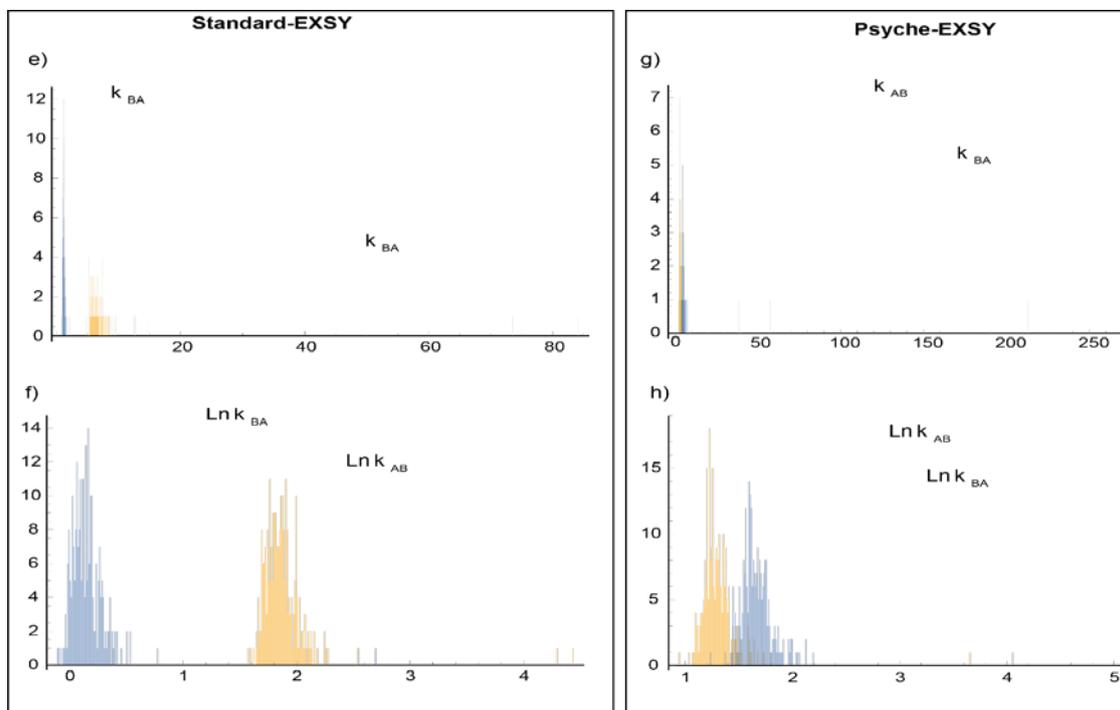
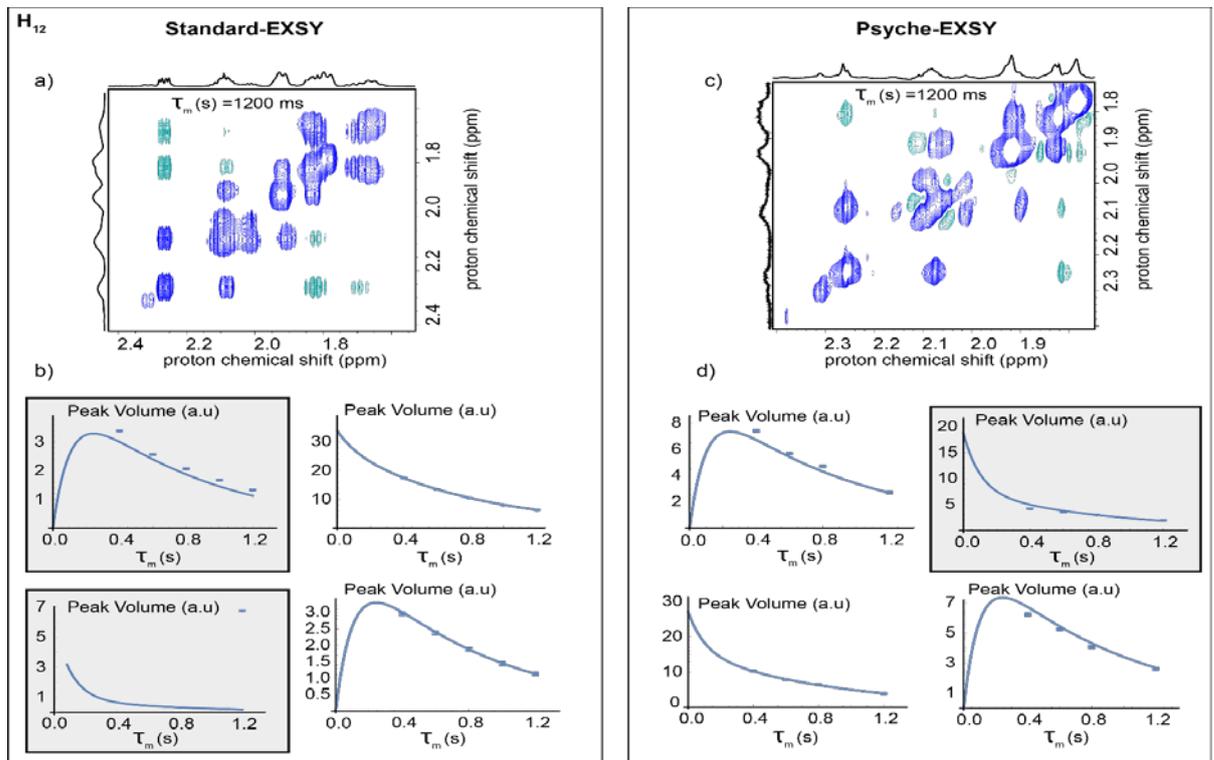
V.A.5  $H_6$ 

V.A.6  $H_7$ V.A.7  $H_7$ 

V.A.8  $H'_7$ 

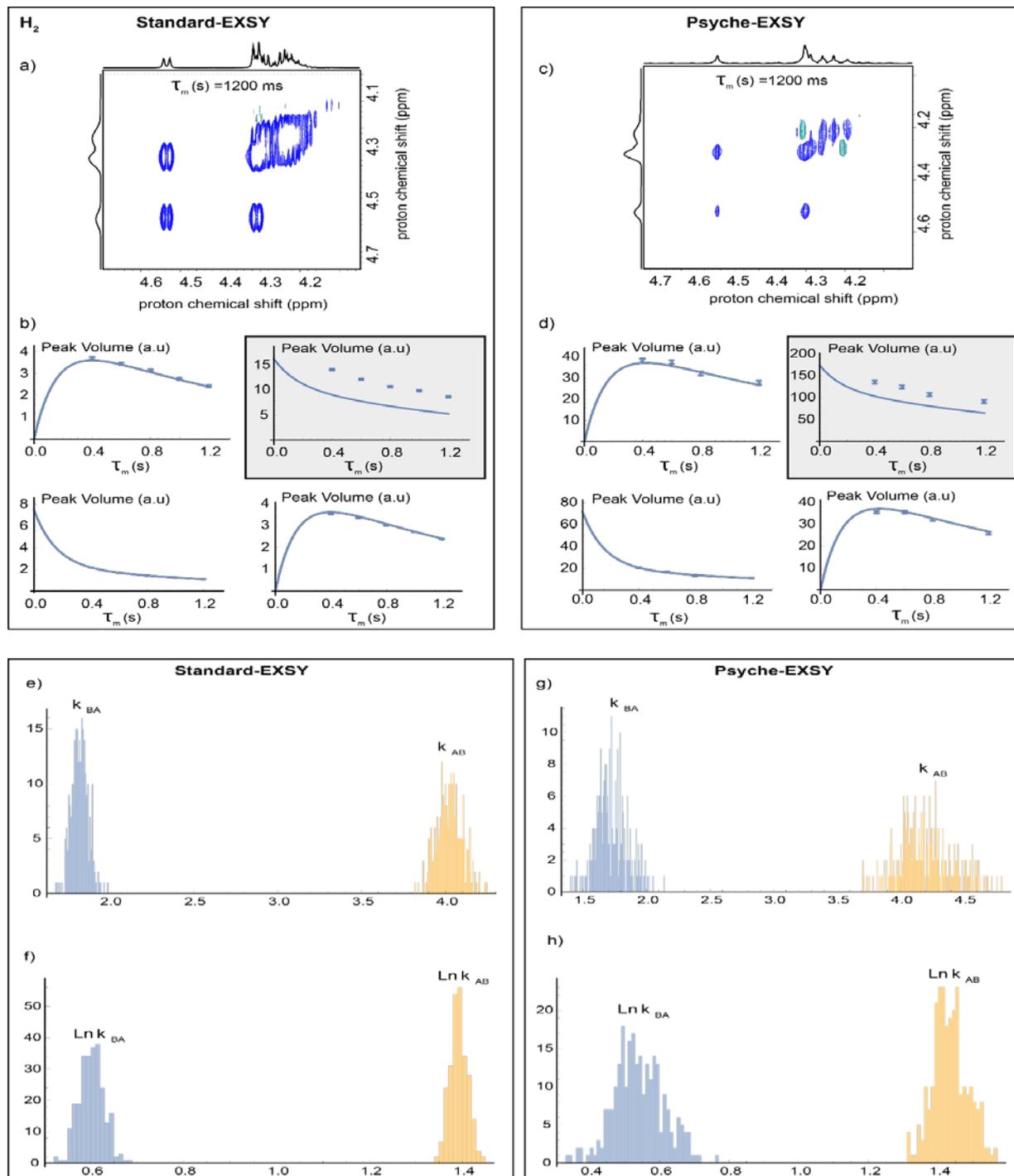
V.A.9  $H_{11}$ 

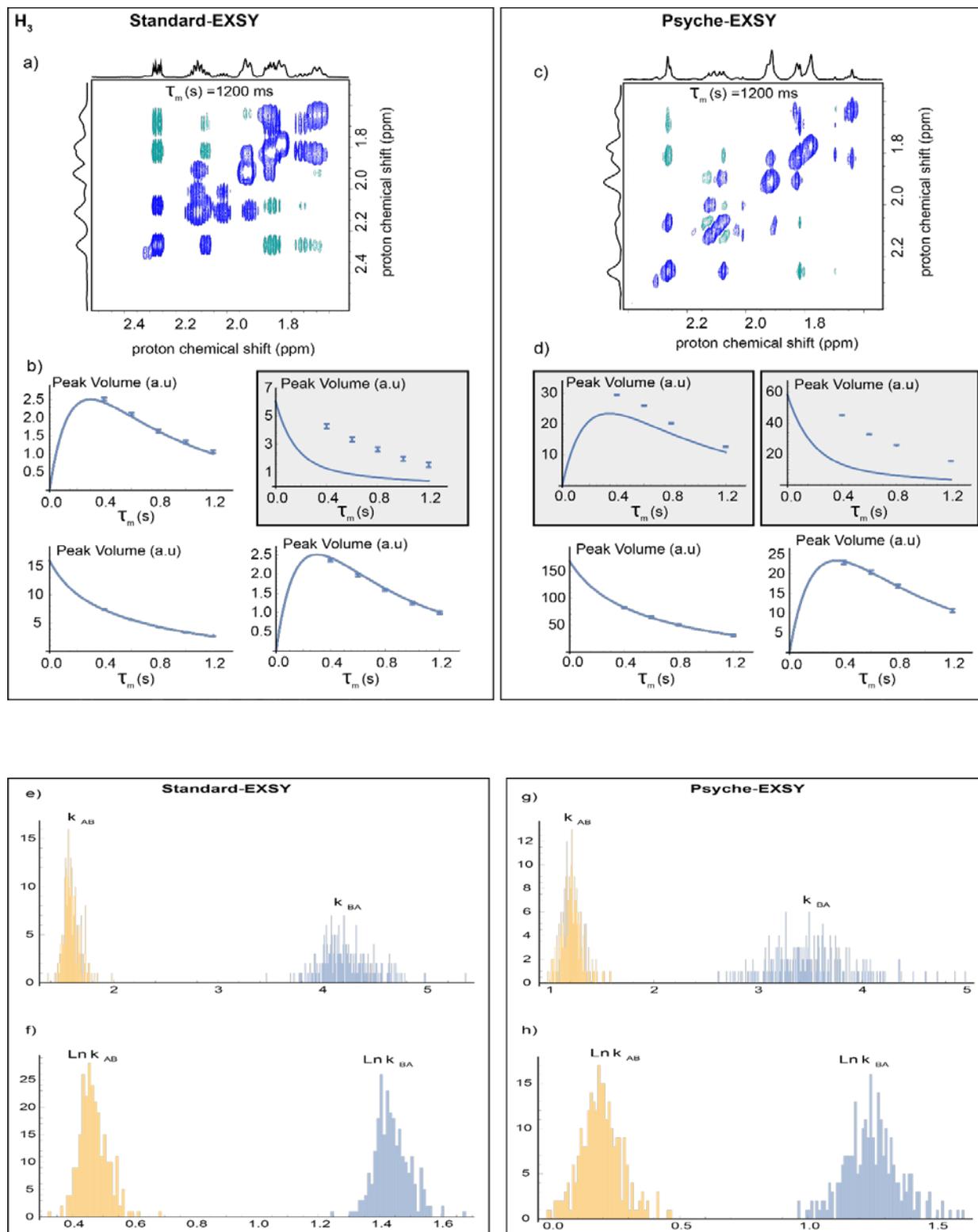
V.A.10  $H'_{12}$ 

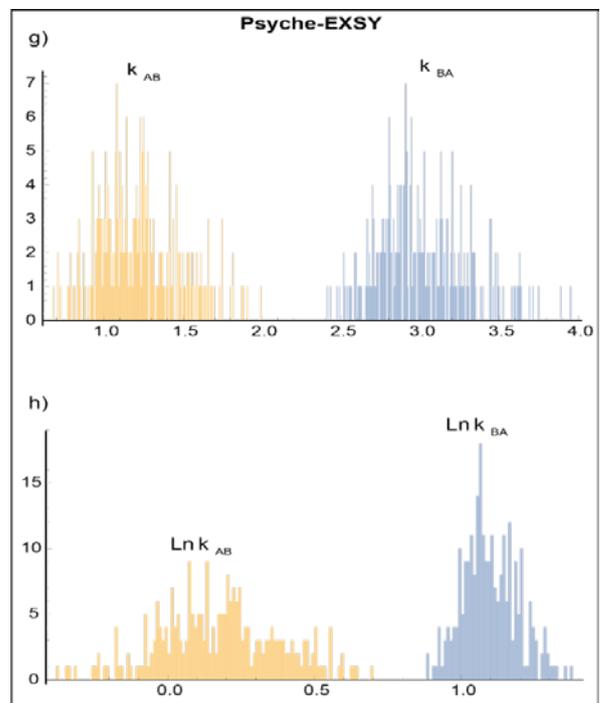
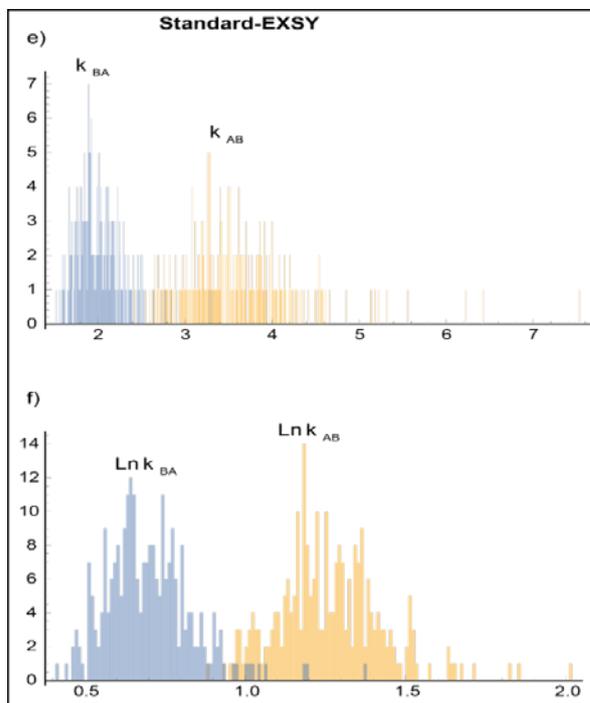
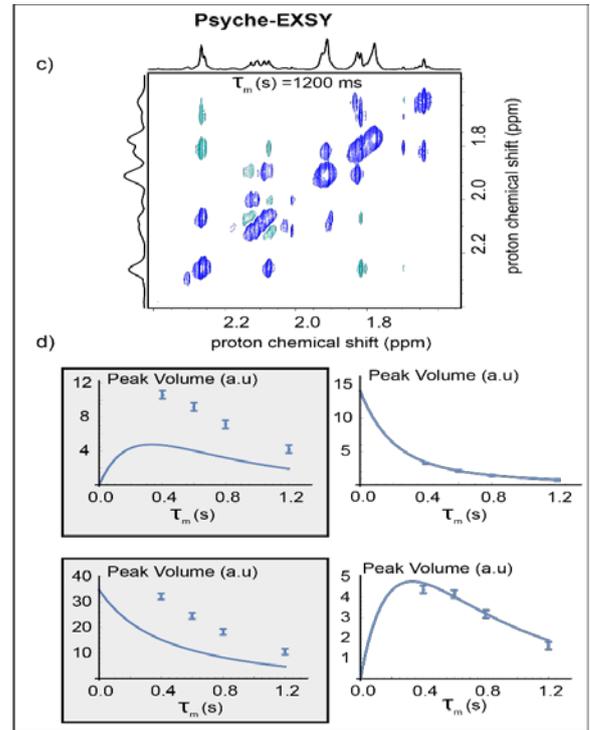
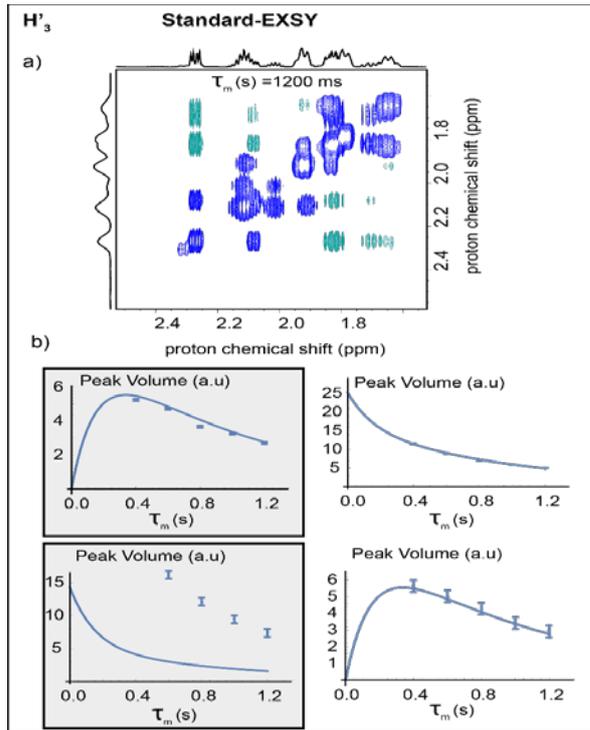
V.A.11  $H_{12}$ 

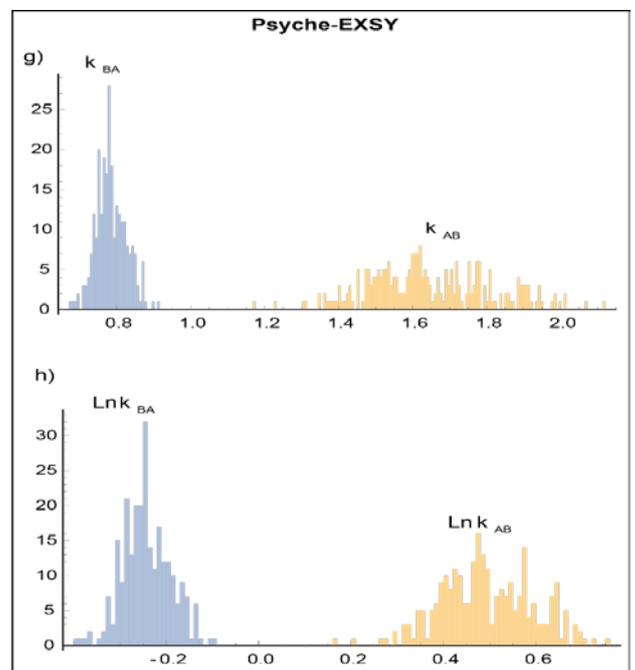
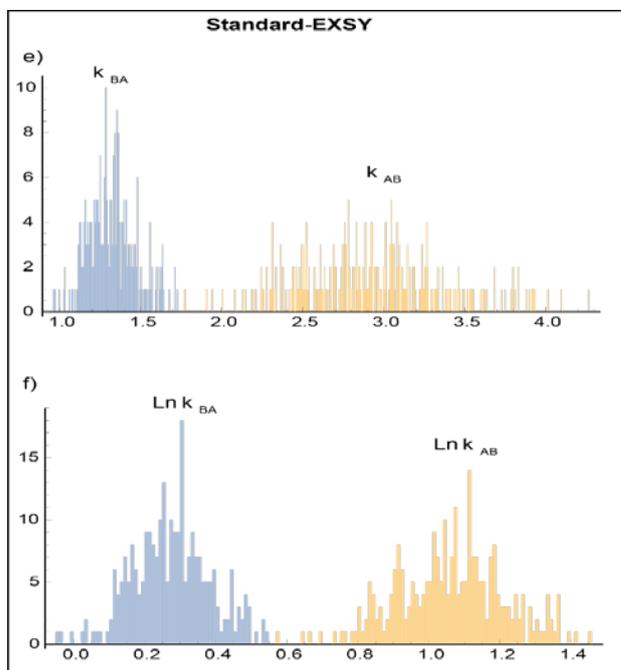
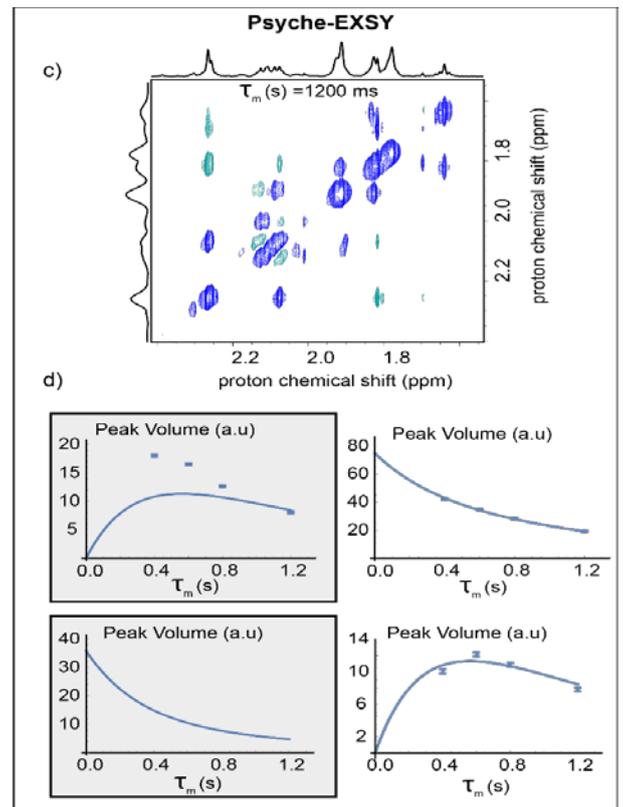
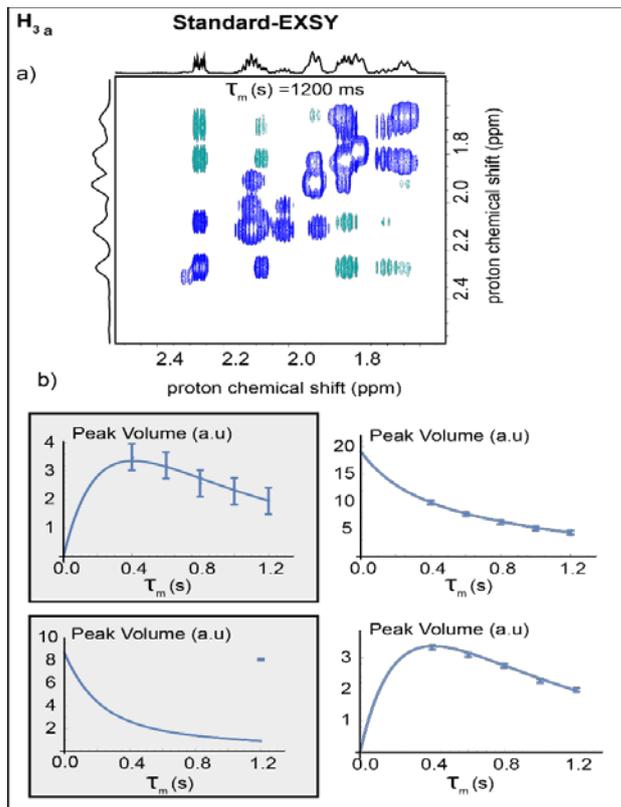


## V.B Spectre EXSY enregistrés à 310 K

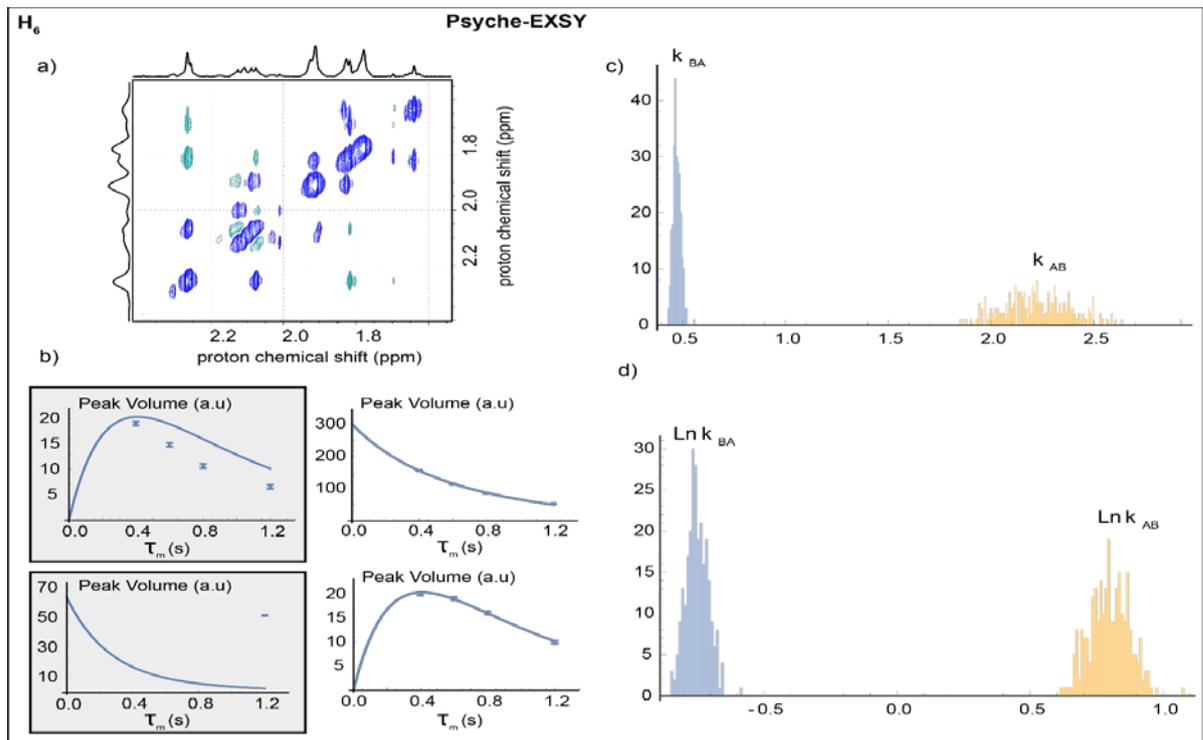
V.B.1  $H_2$ 

V.B.2  $H_3$ 

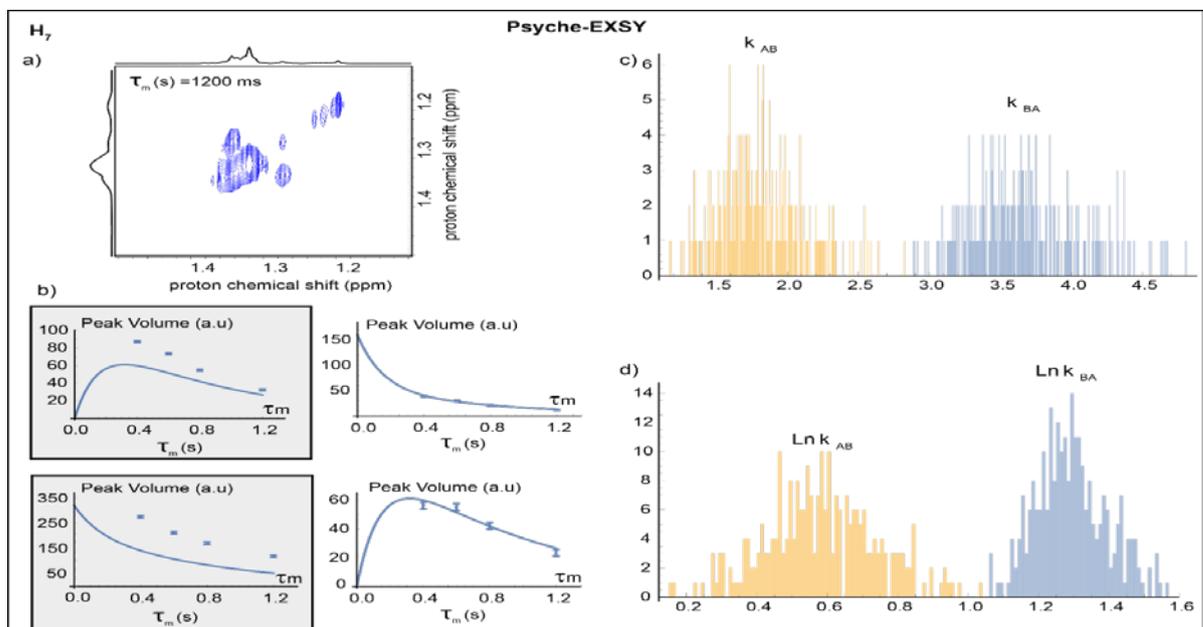
V.B.3  $H'_3$ 

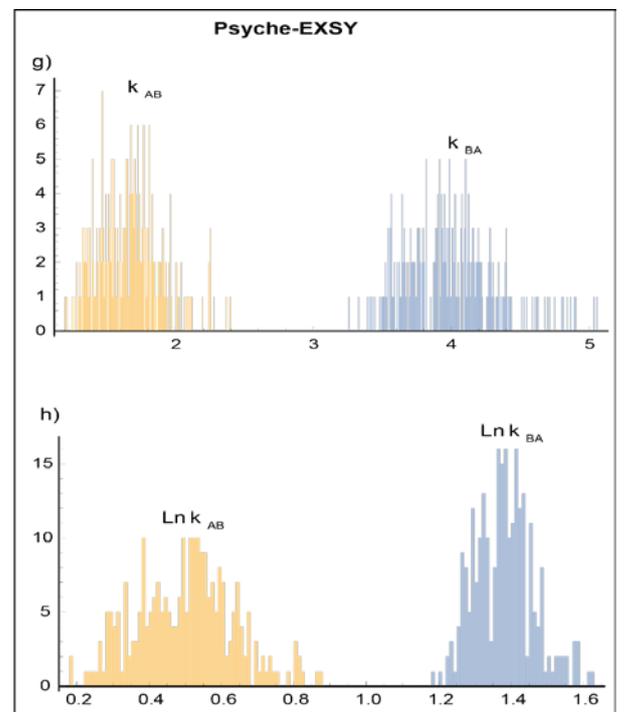
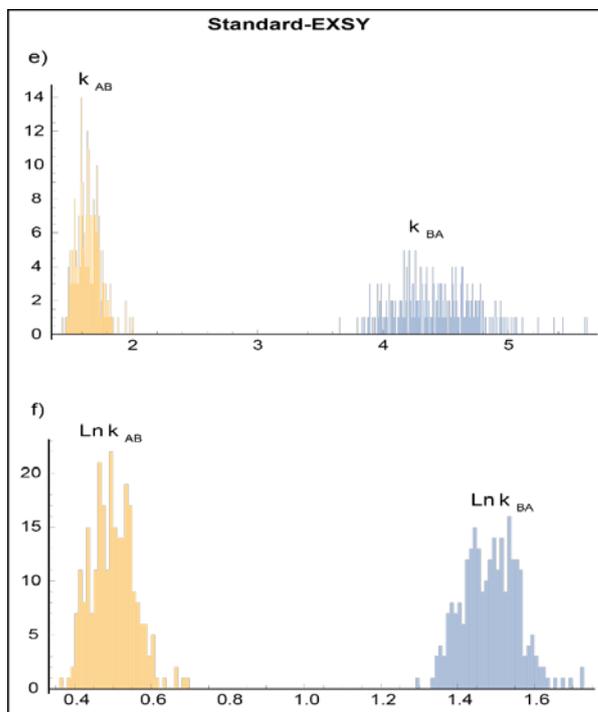
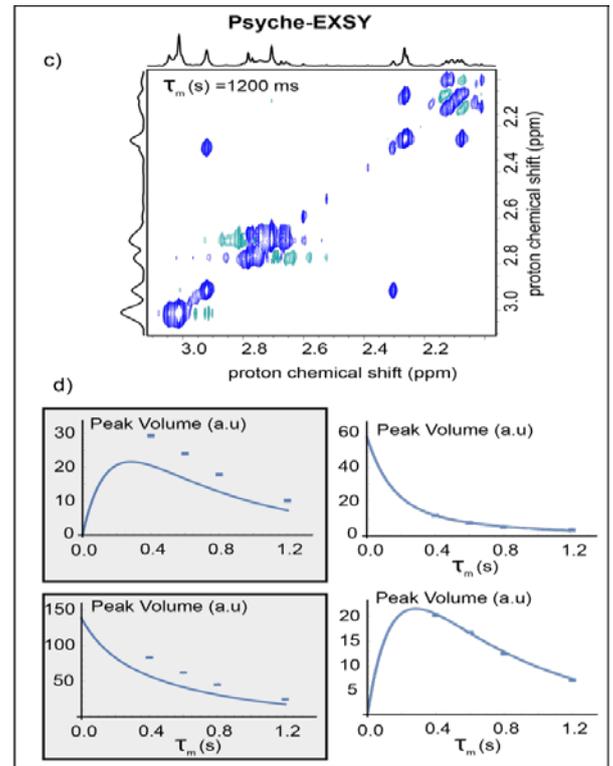
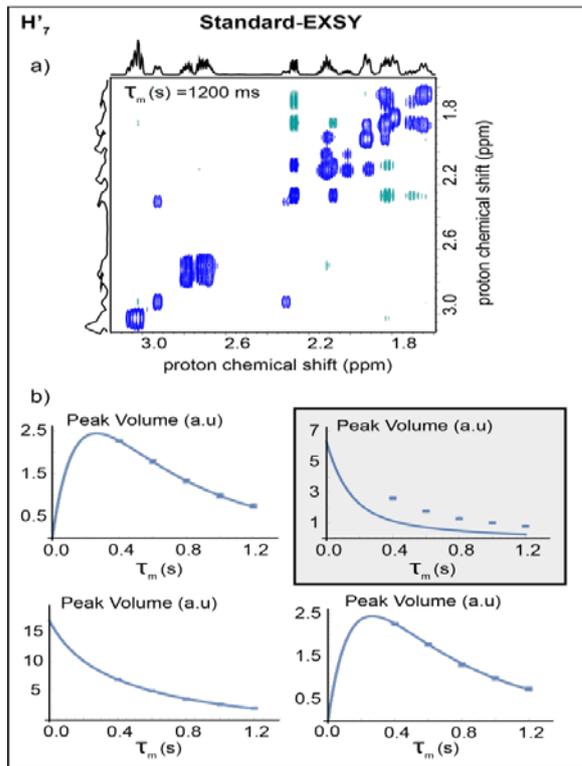
V.B.4  $H_{3a}$ 

## V.B.5 H6

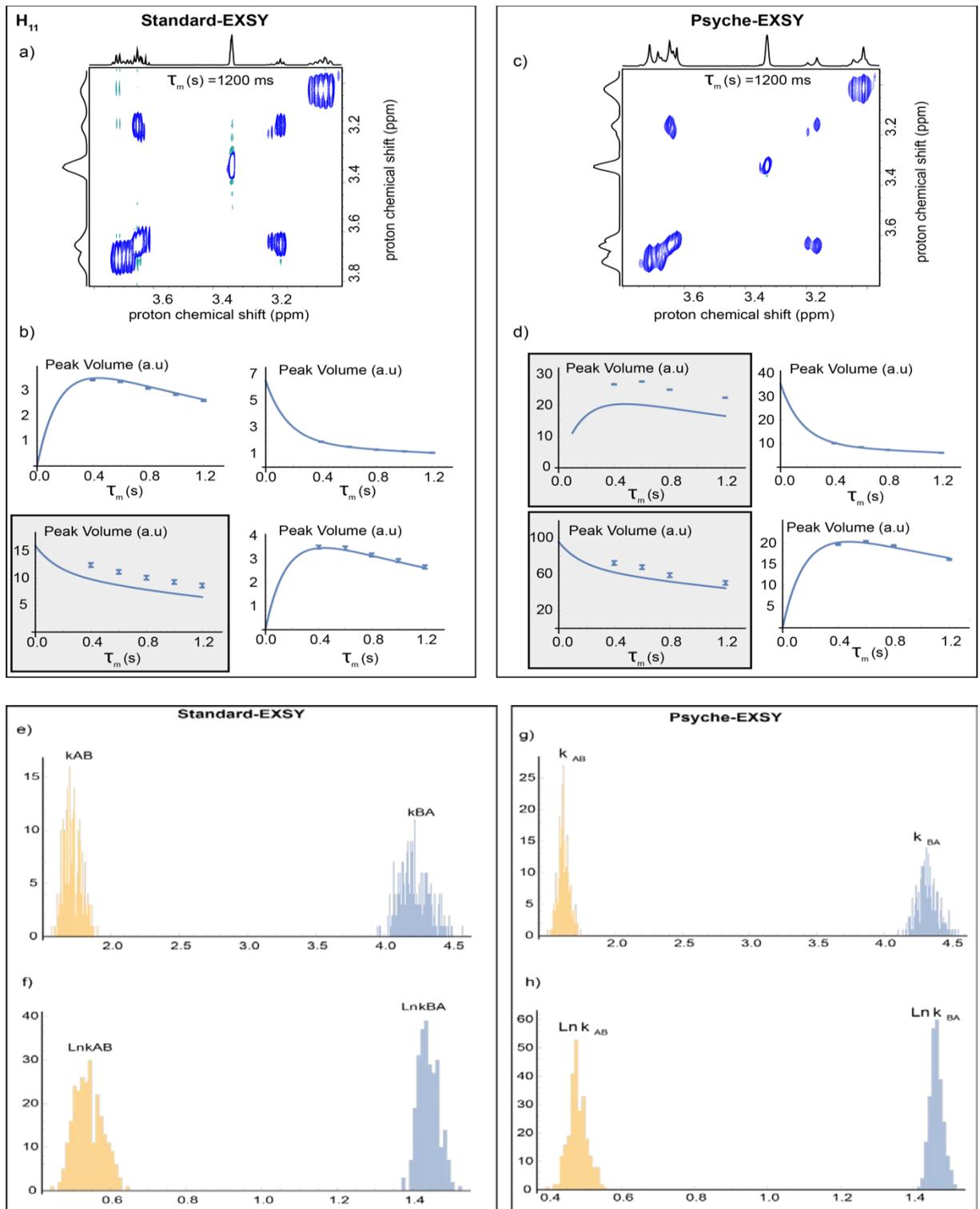


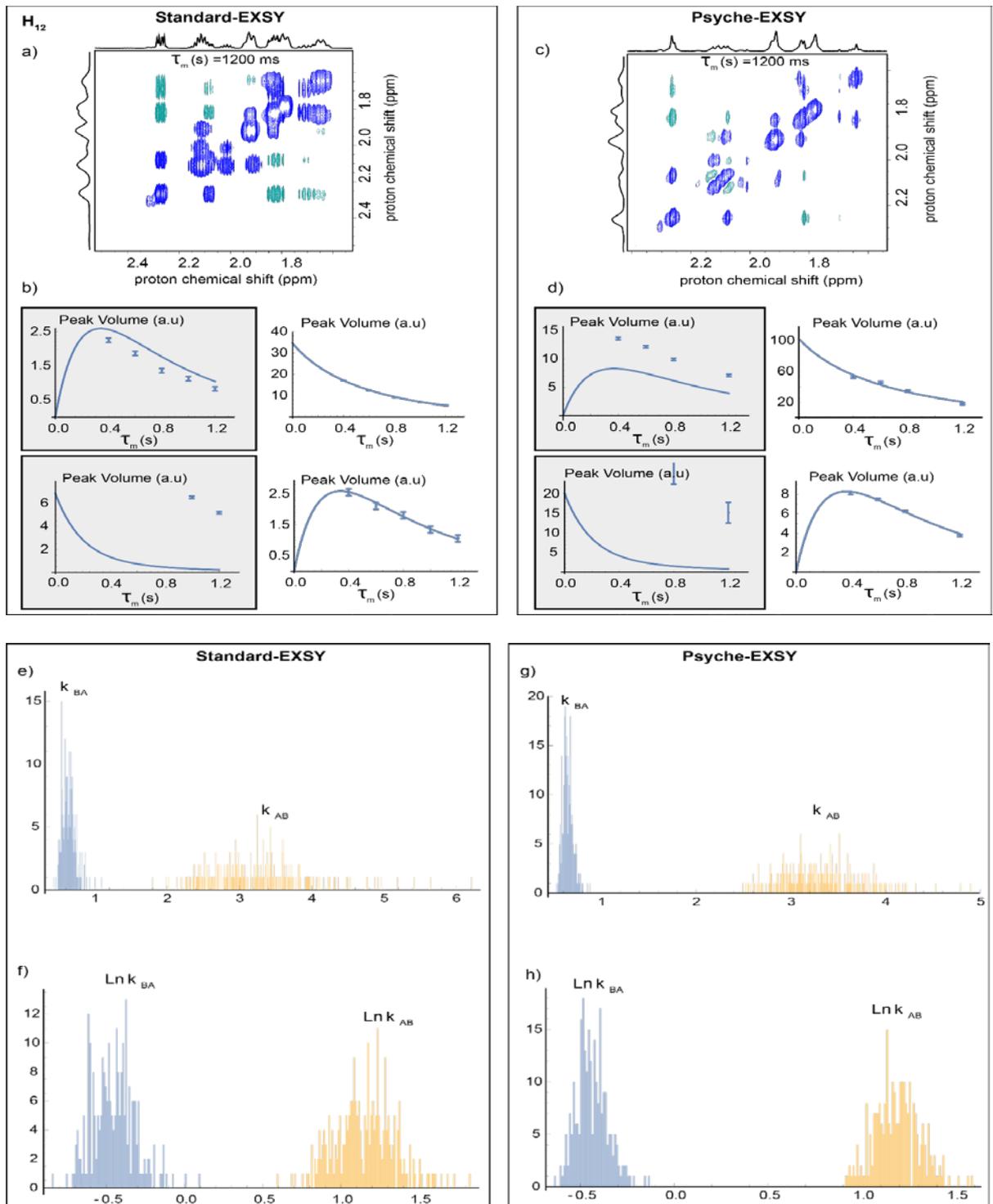
## V.B.6 H7

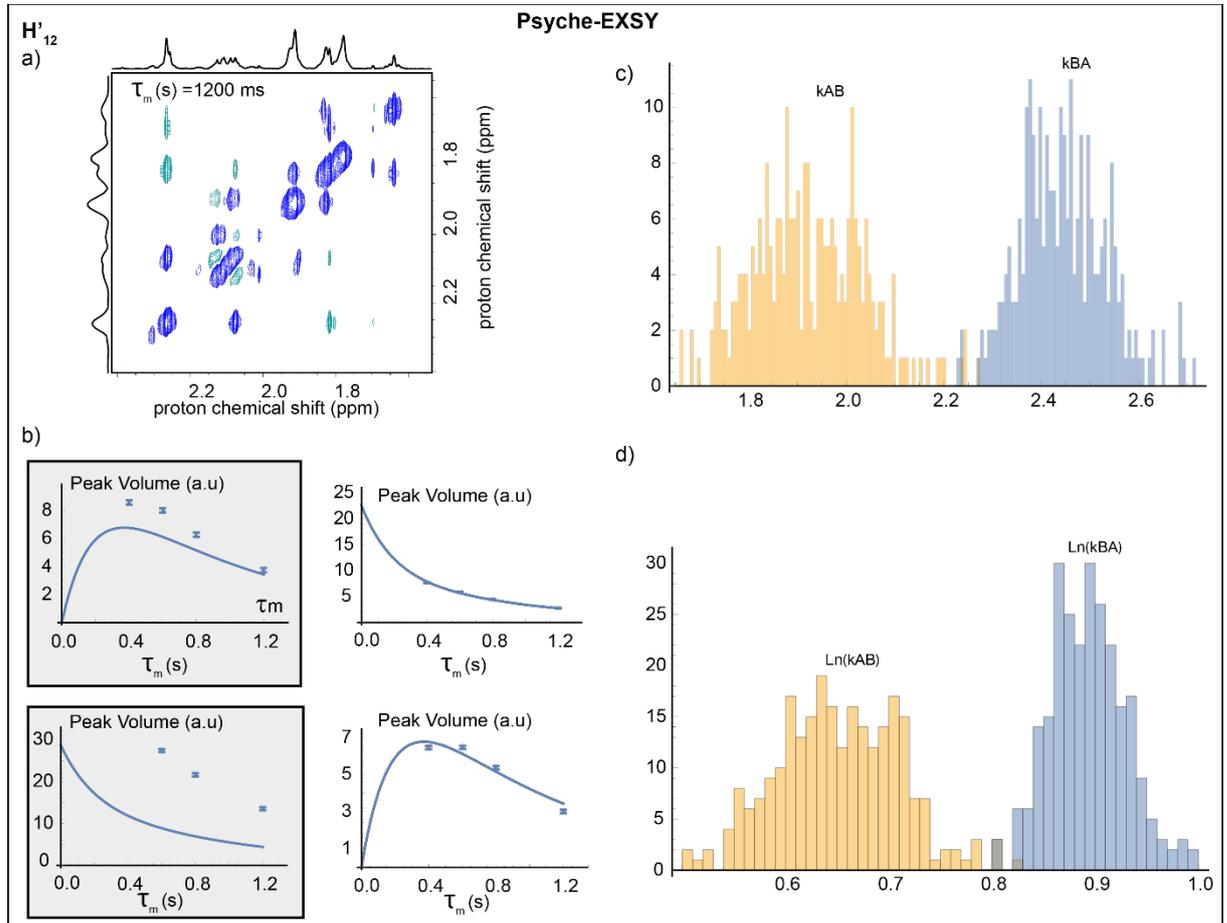


H<sup>7</sup>

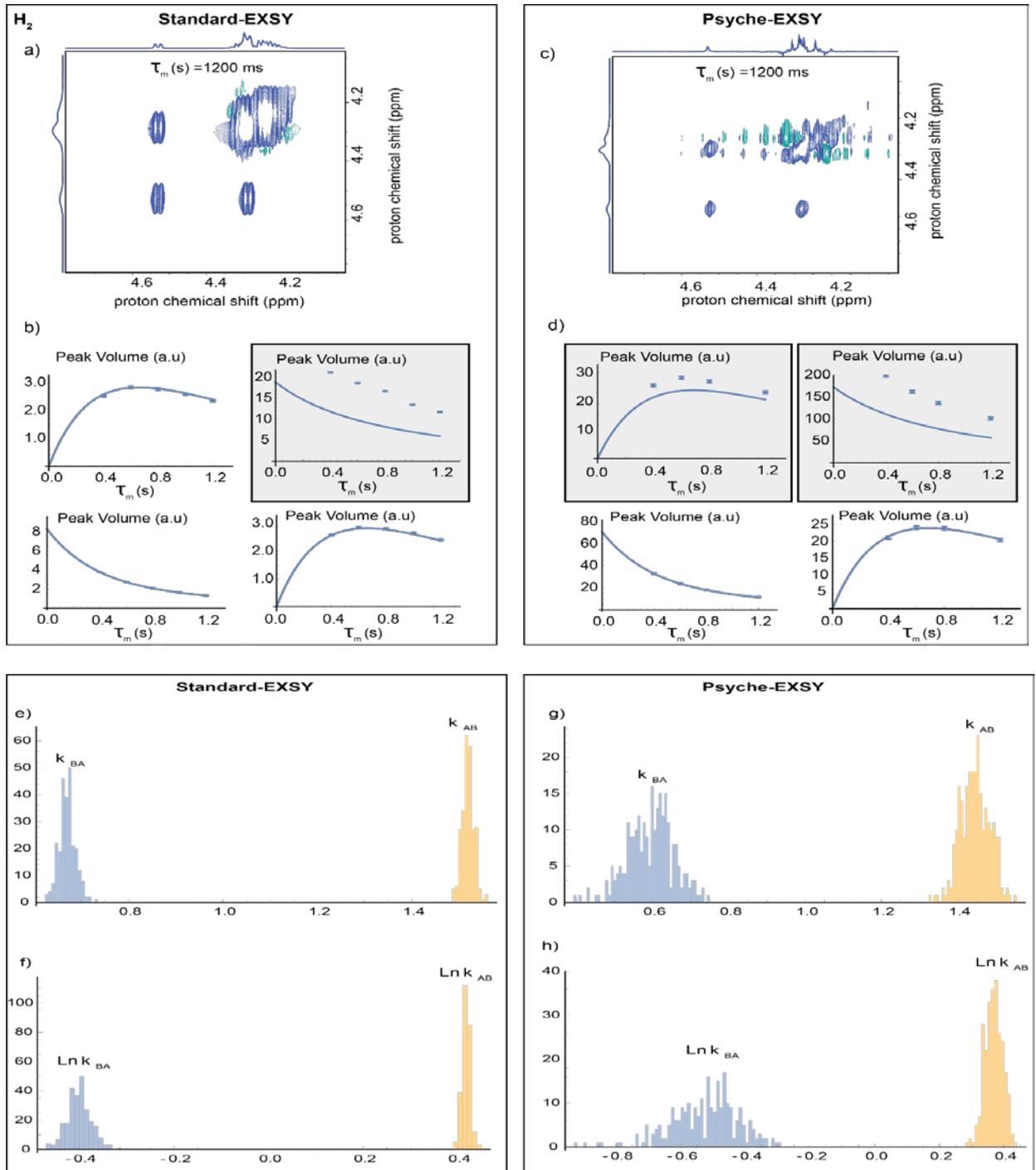
## V.B.7 H11

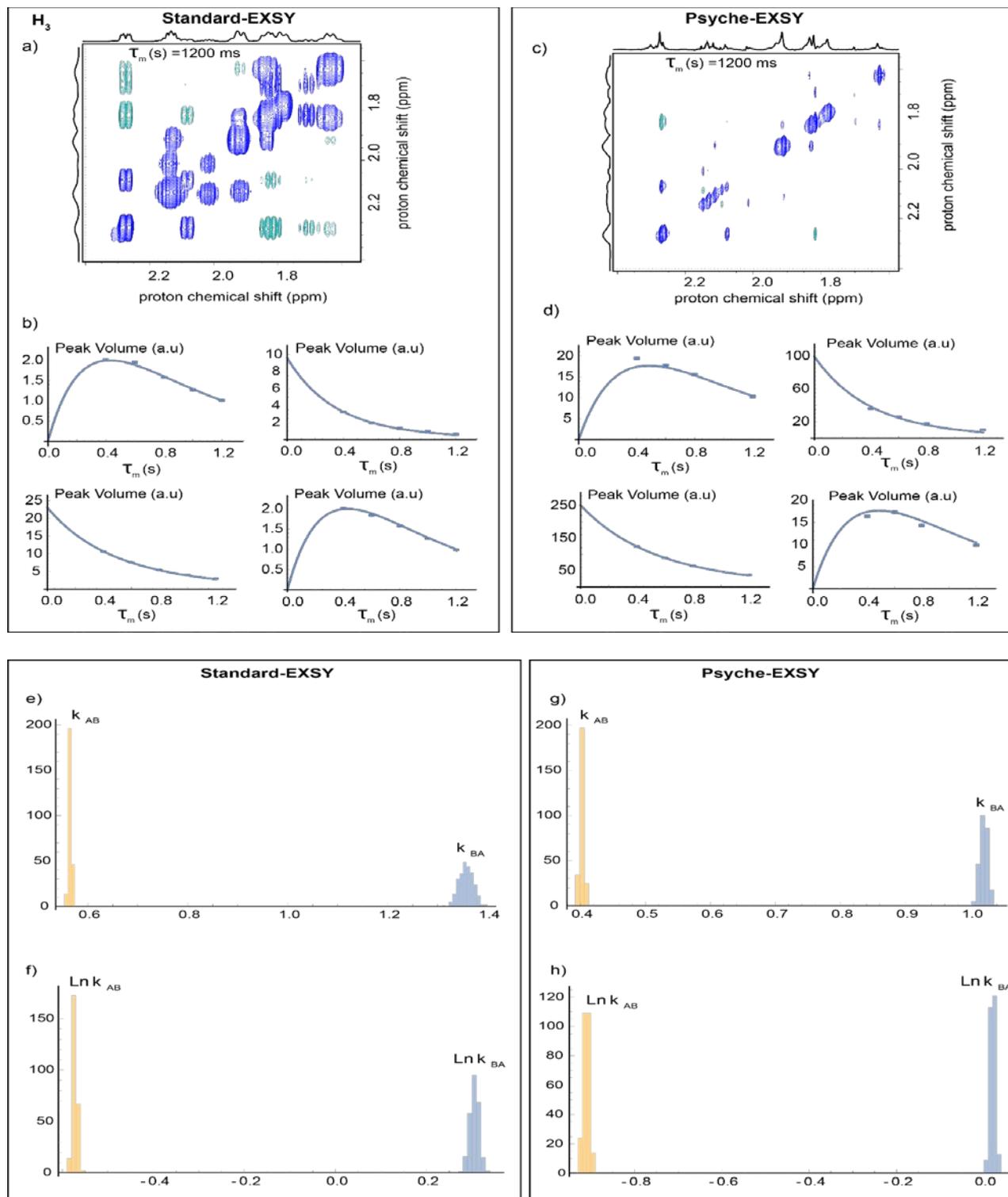


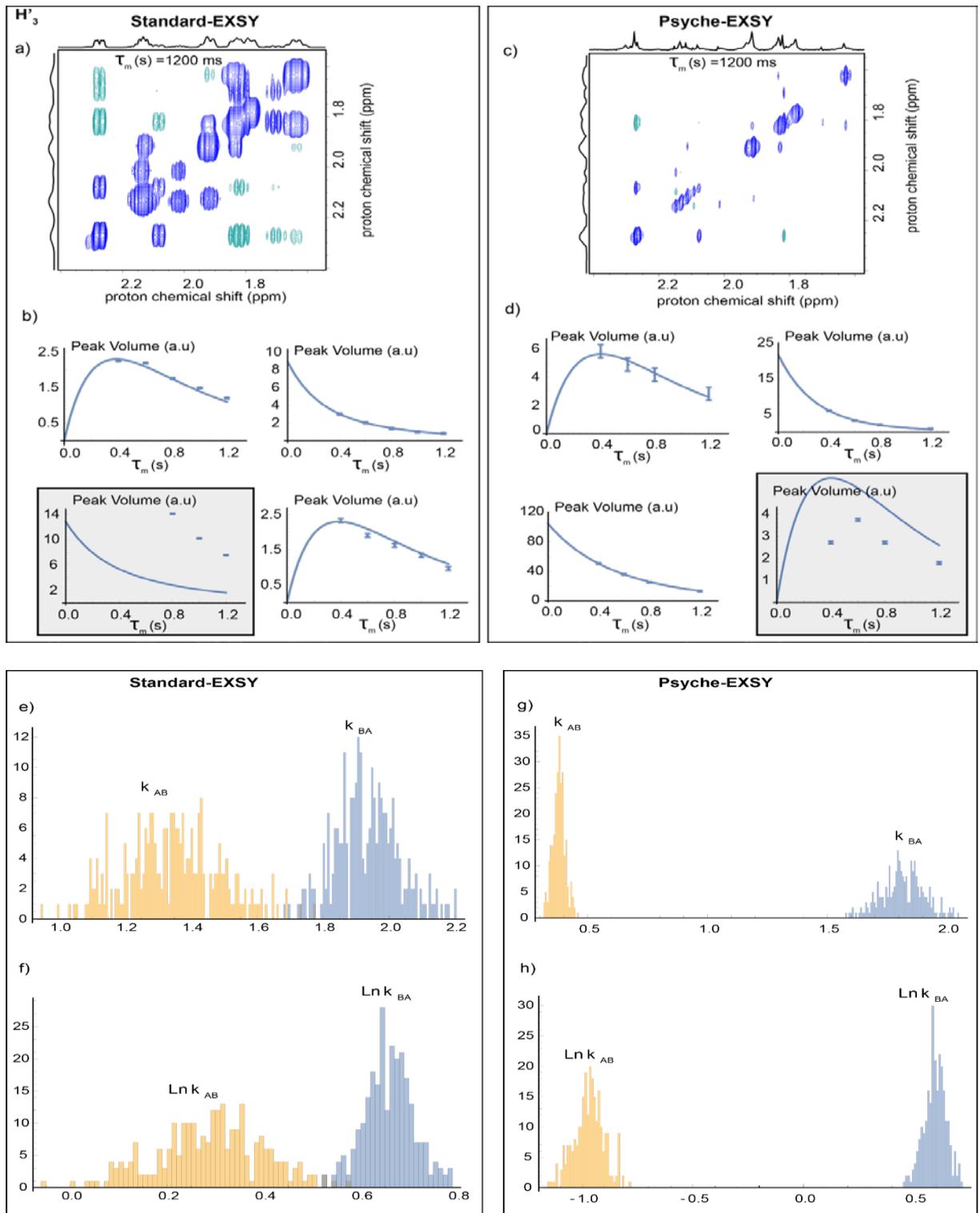


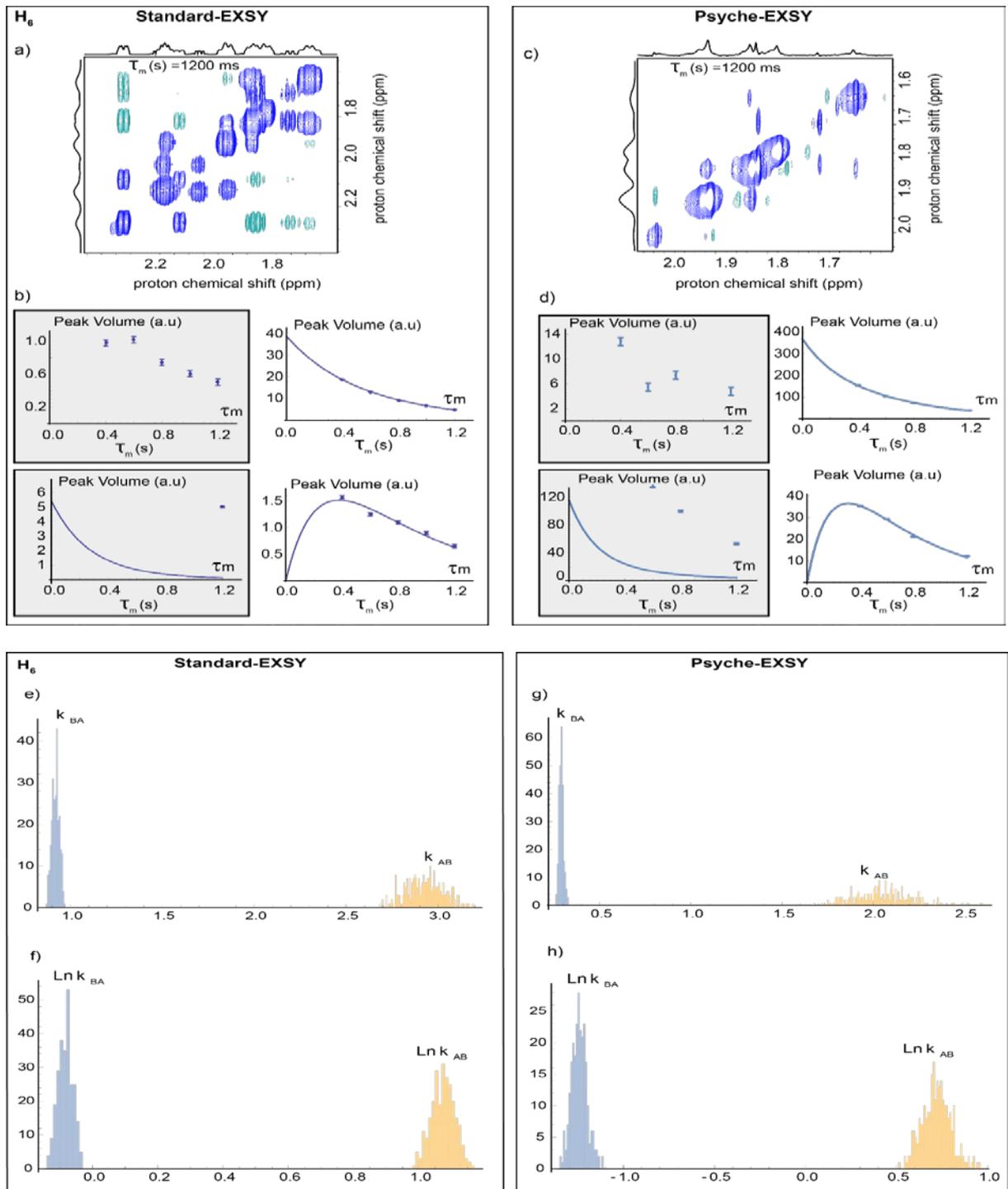
V.B.9  $H'_{12}$ 

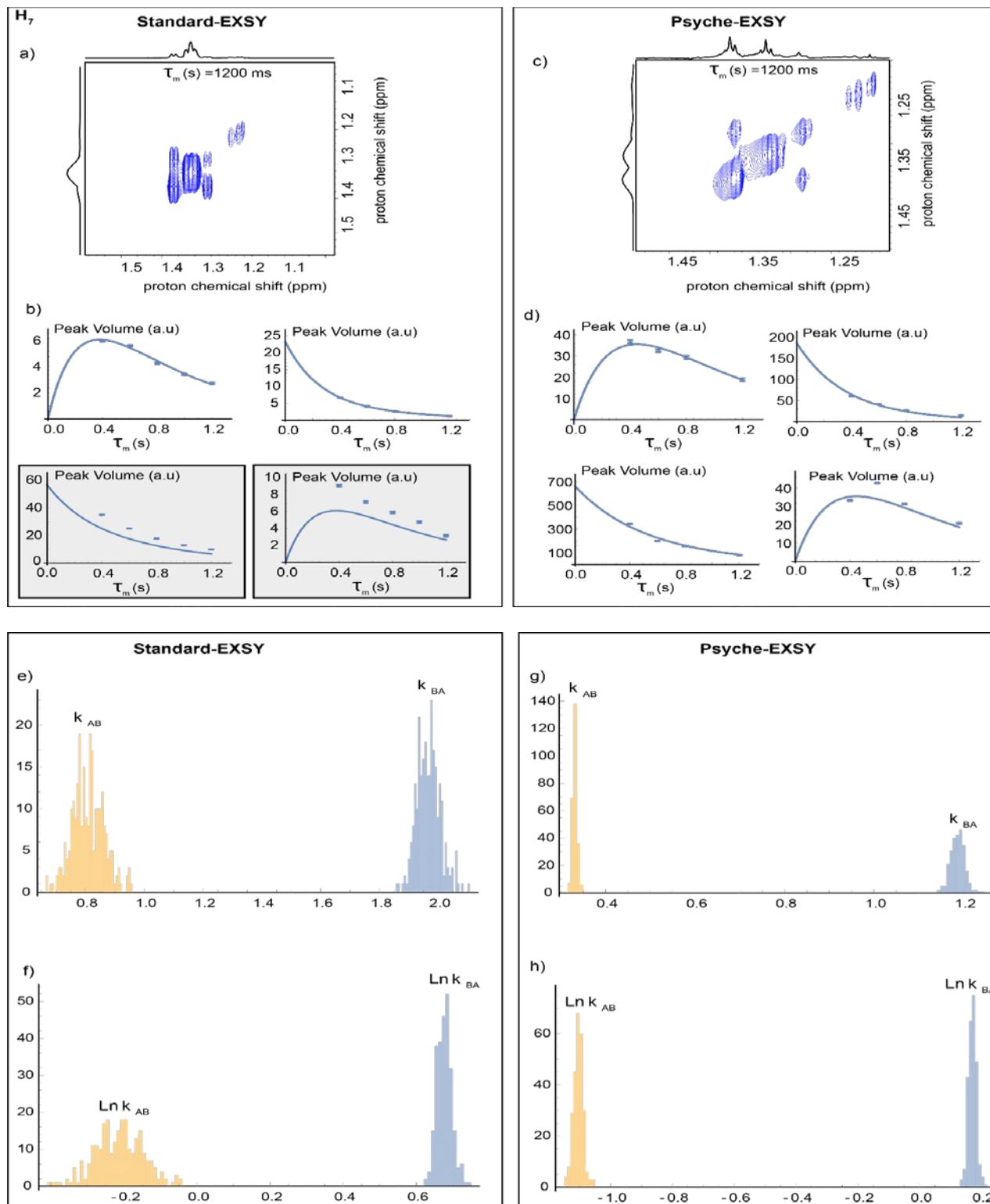
## V.C Spectre EXSY enregistrés à 300 K

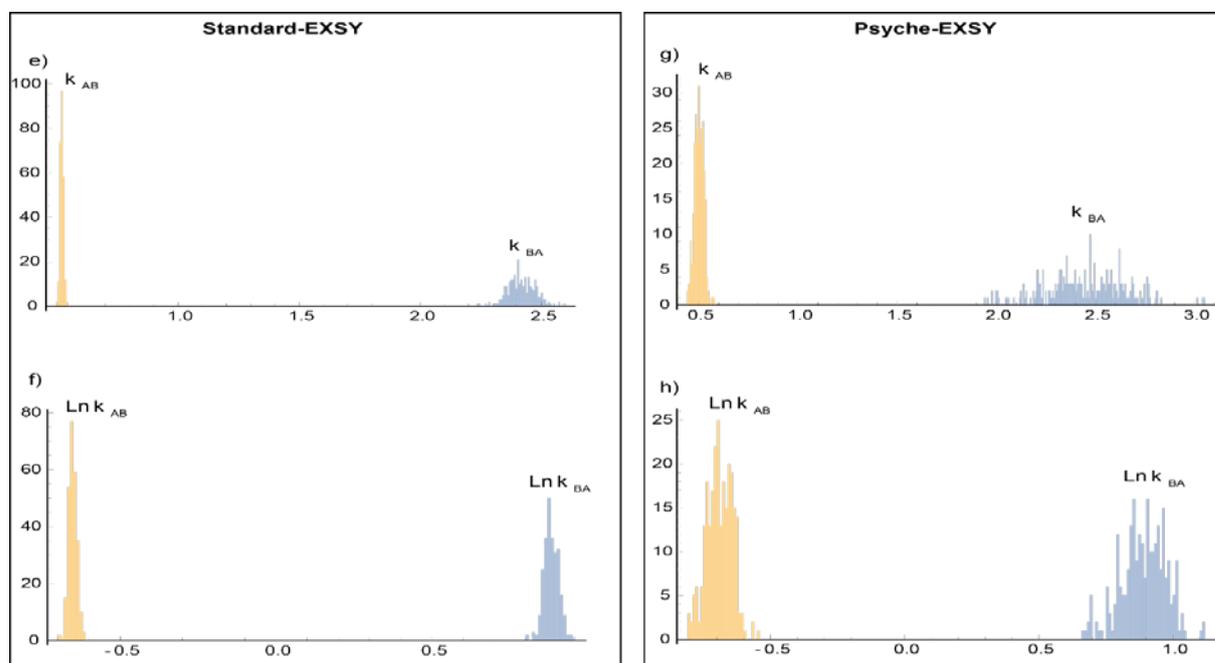
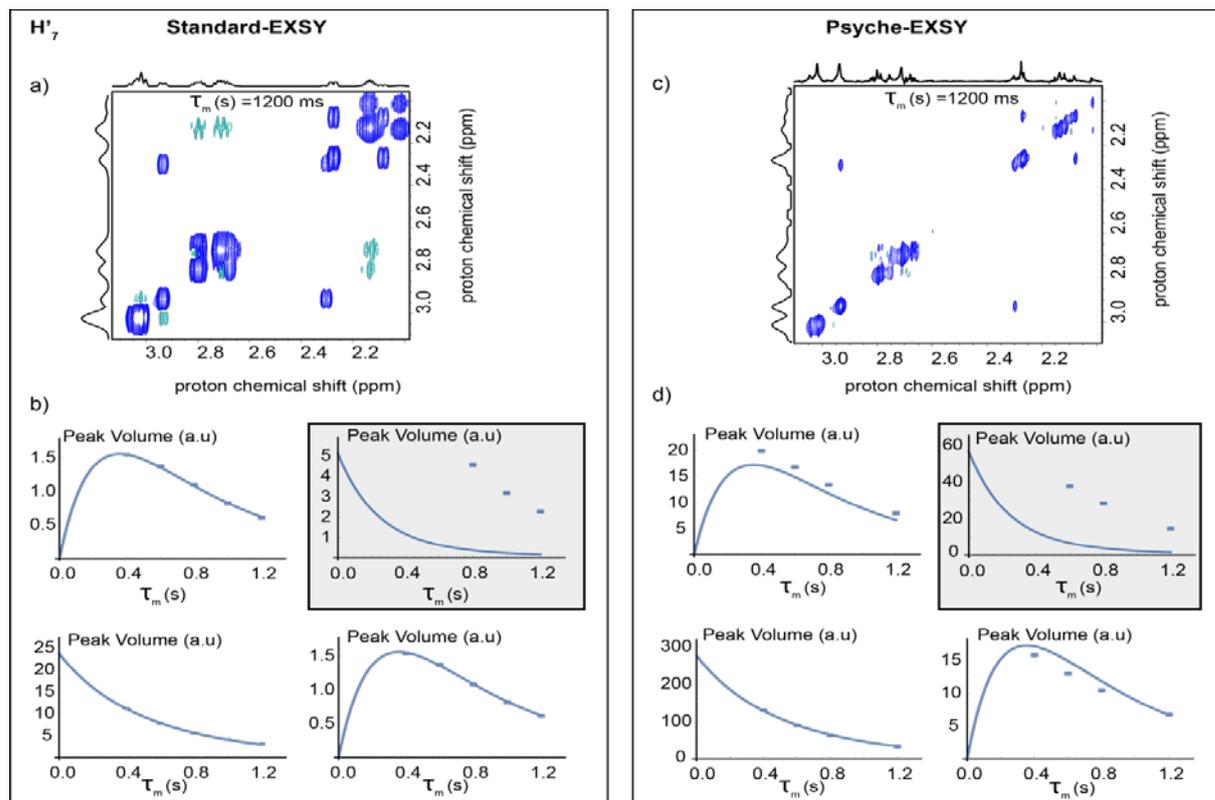
V.C.1 H<sub>2</sub>

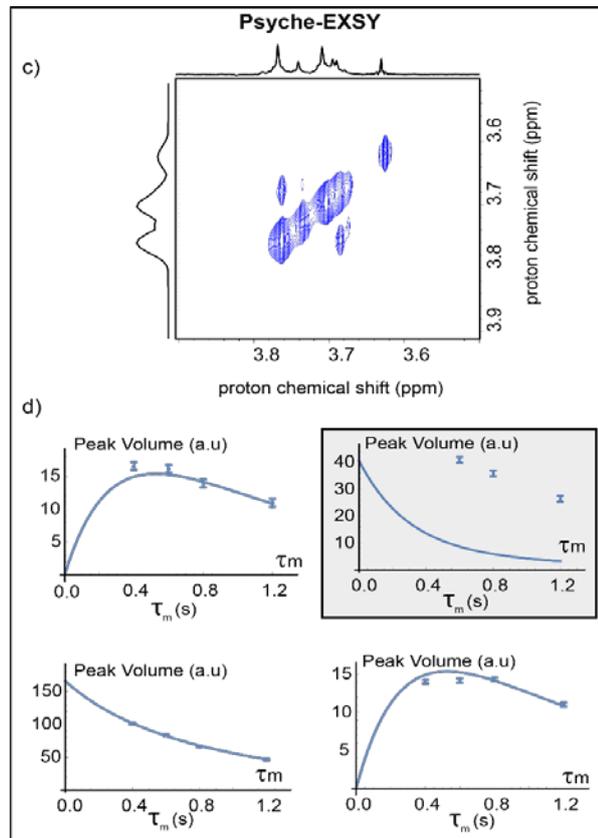
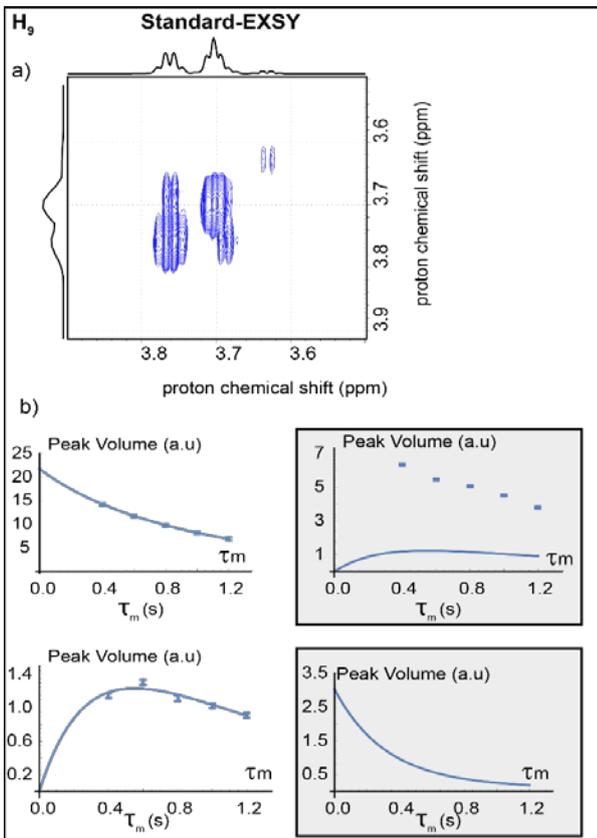


V.C.3  $H'_3$ 

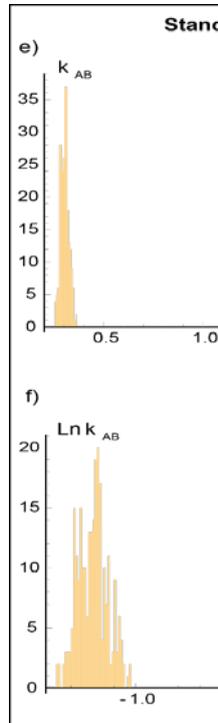




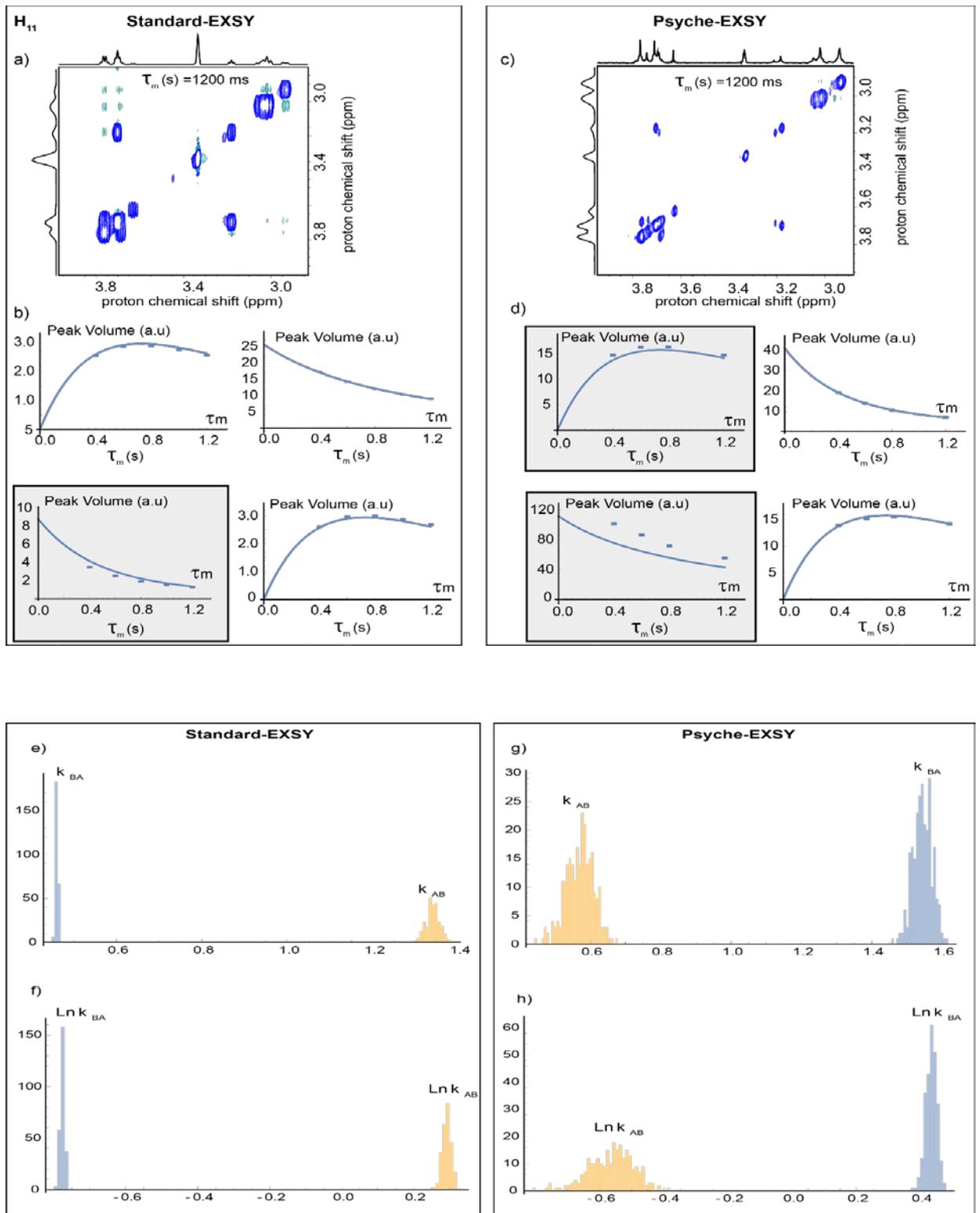
V.C.6  $H'_7$ 

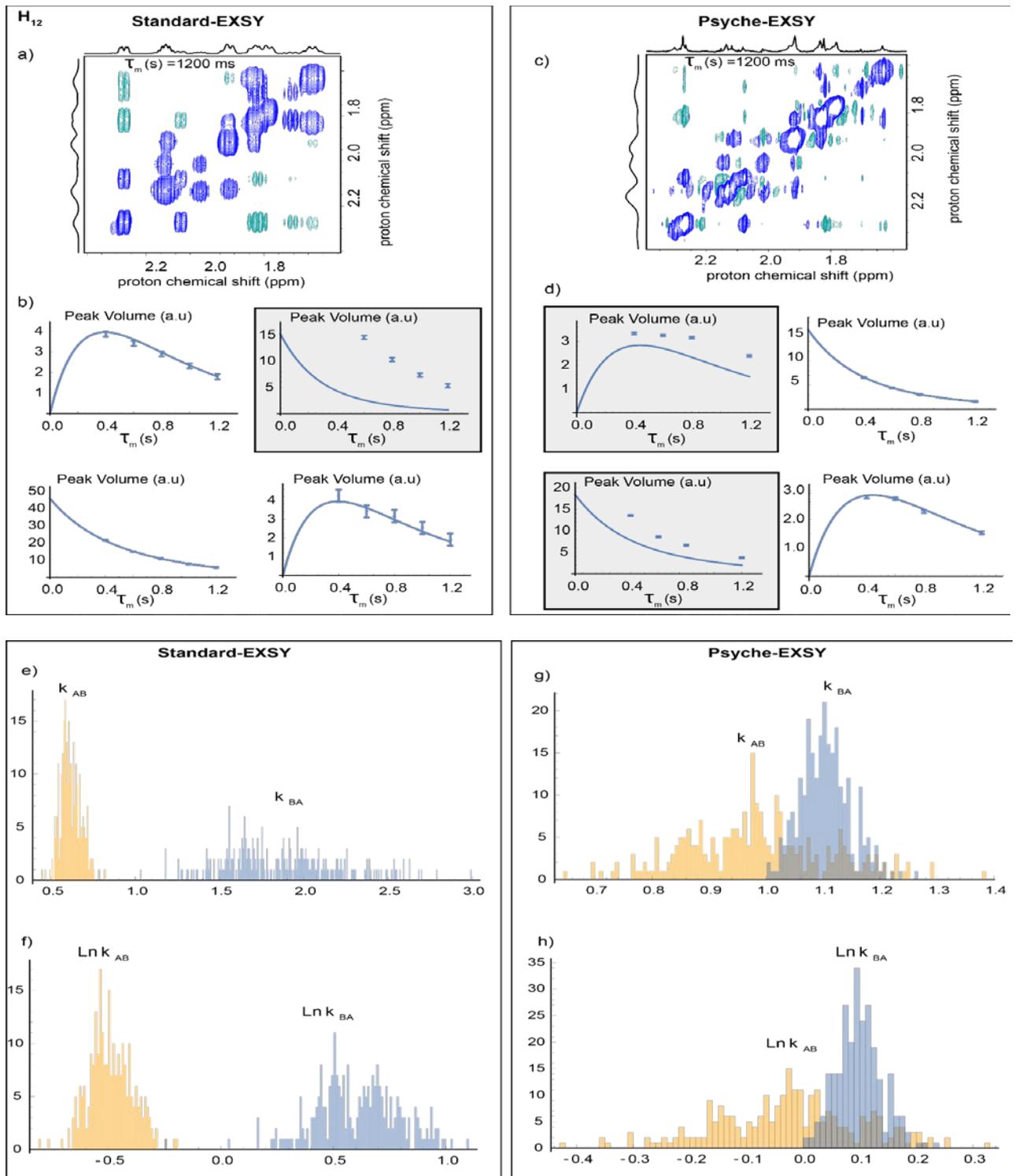


9

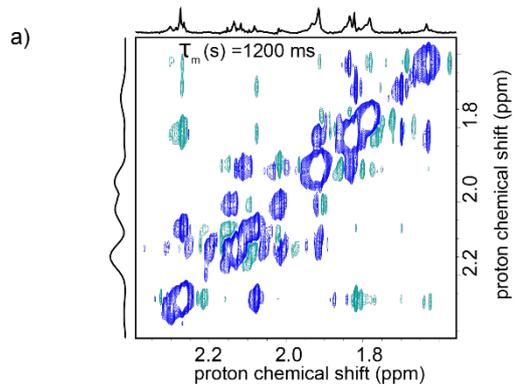


## V.C.8 H11

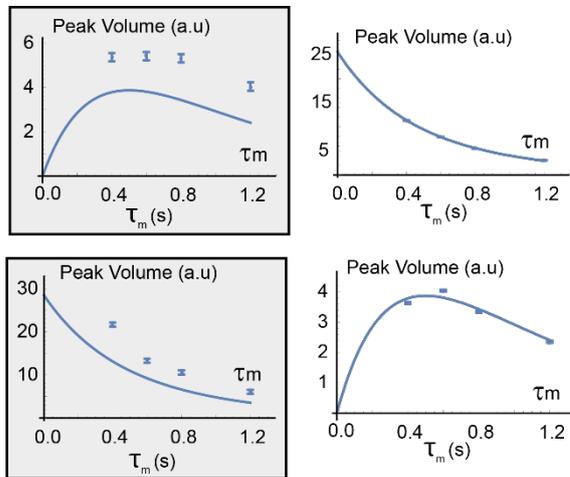




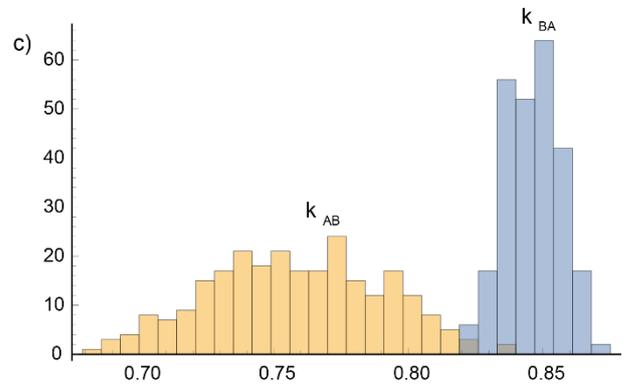
## V.C.10 H'12

H'<sub>12</sub>

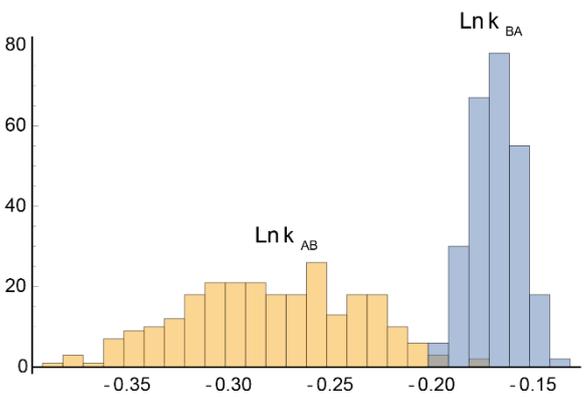
b)



Psyche-EXSY

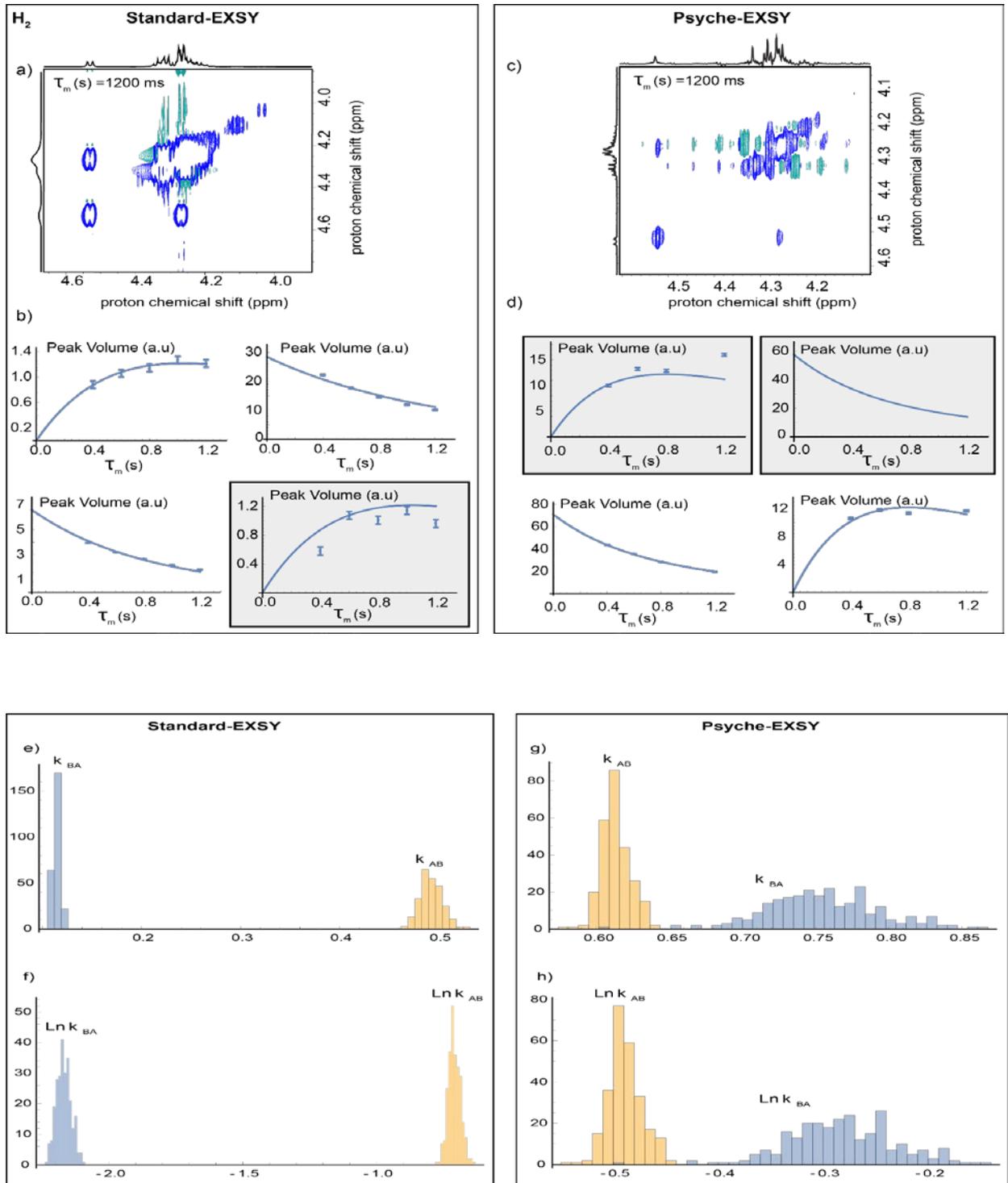


d)

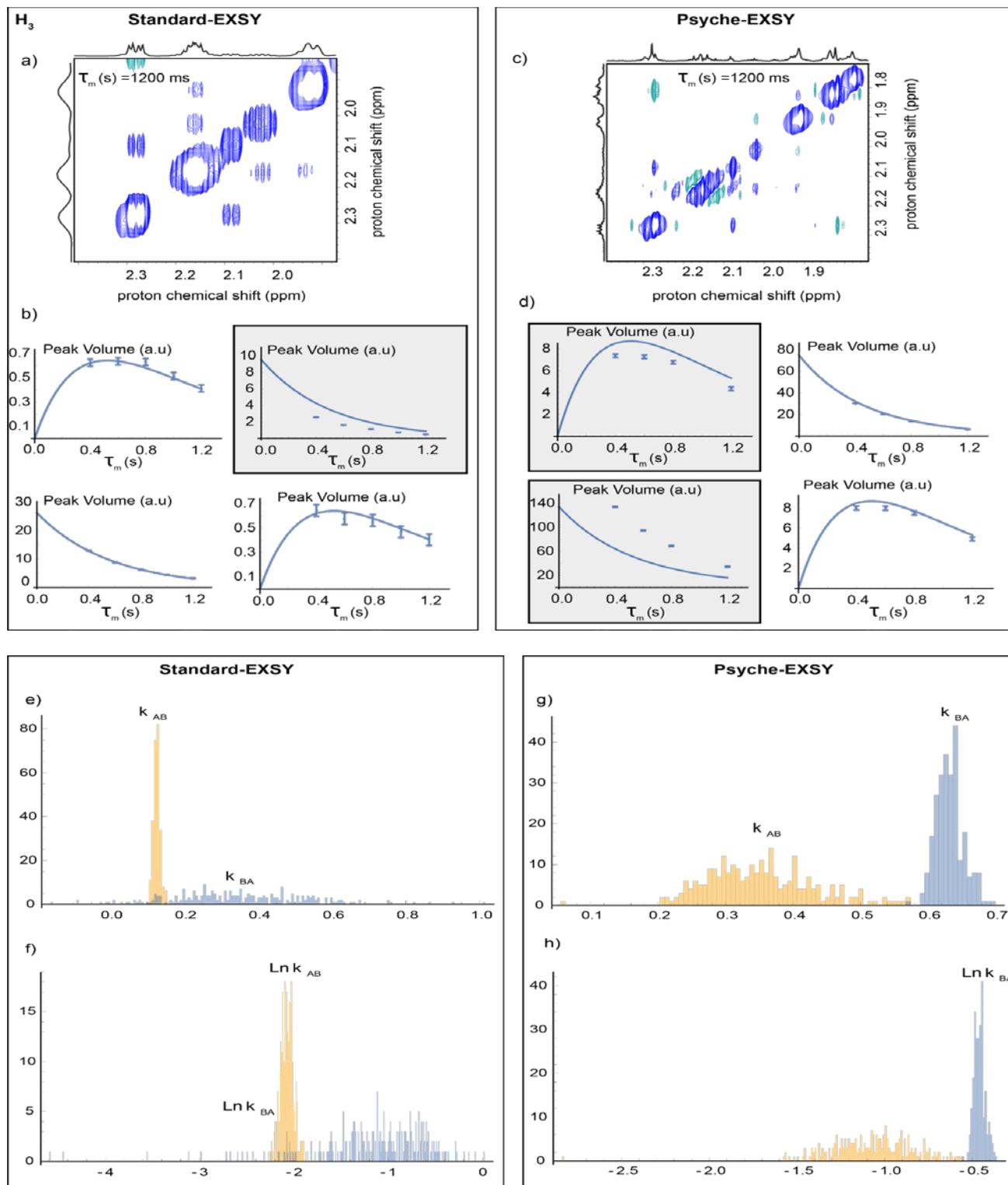


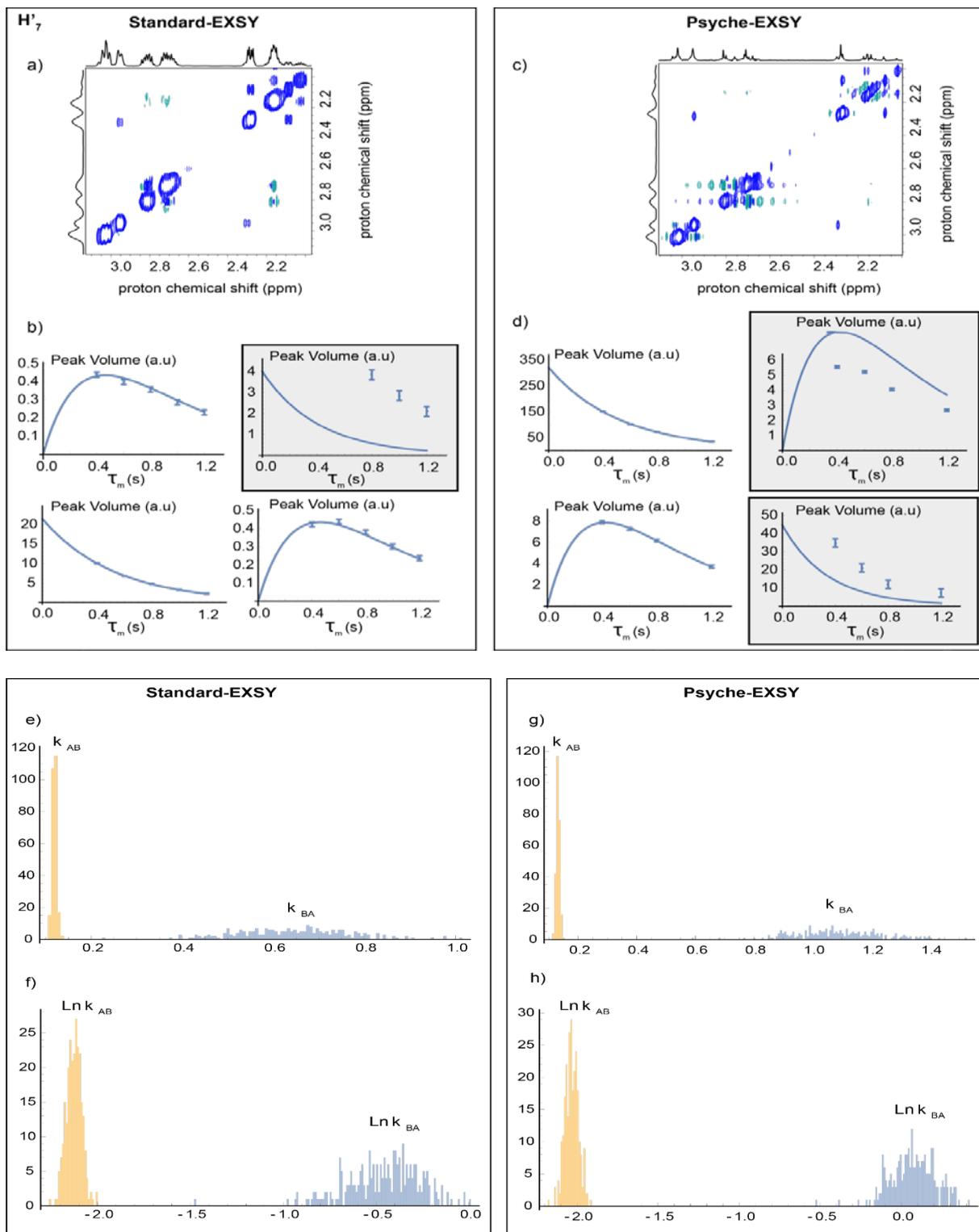
## V.D Spectre EXSY enregistrés à 290 K

## V.D.1 H2

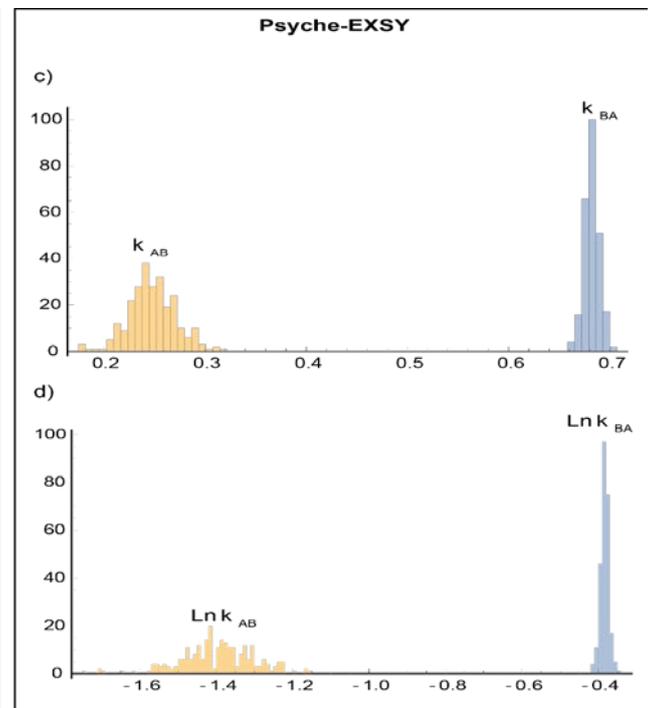
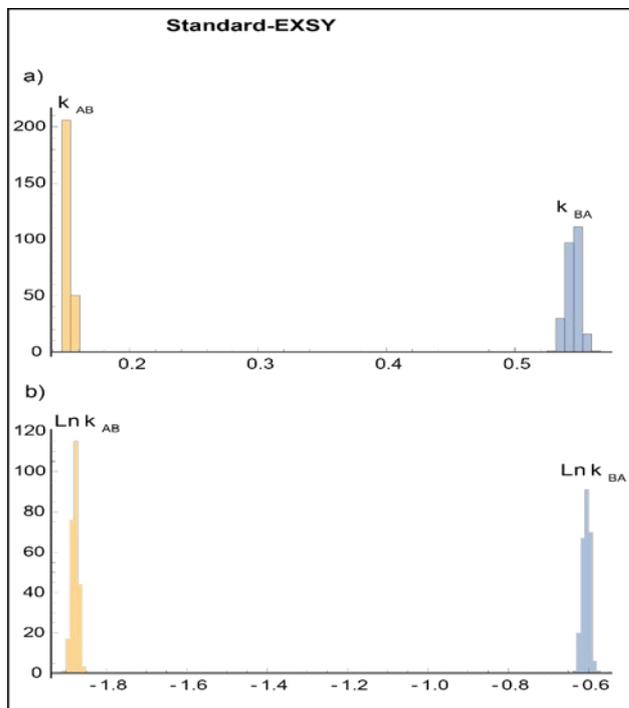
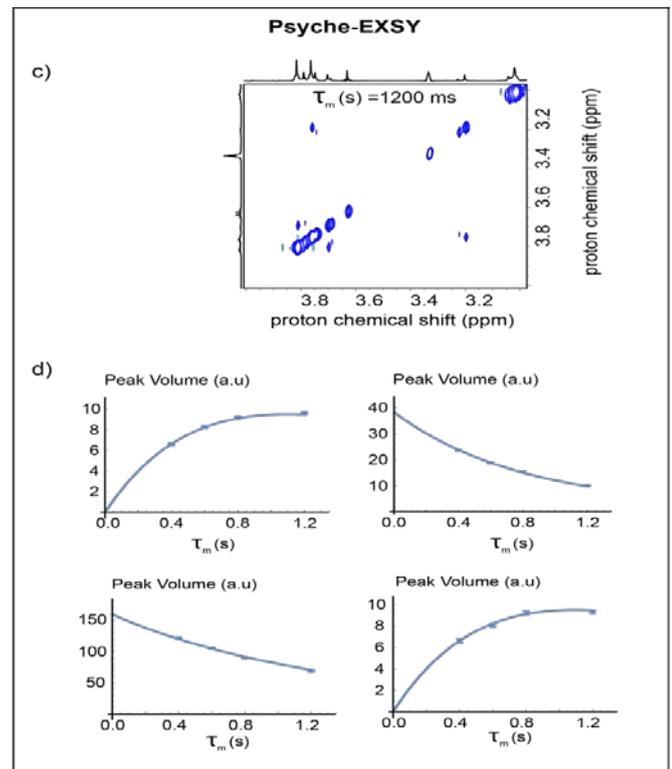
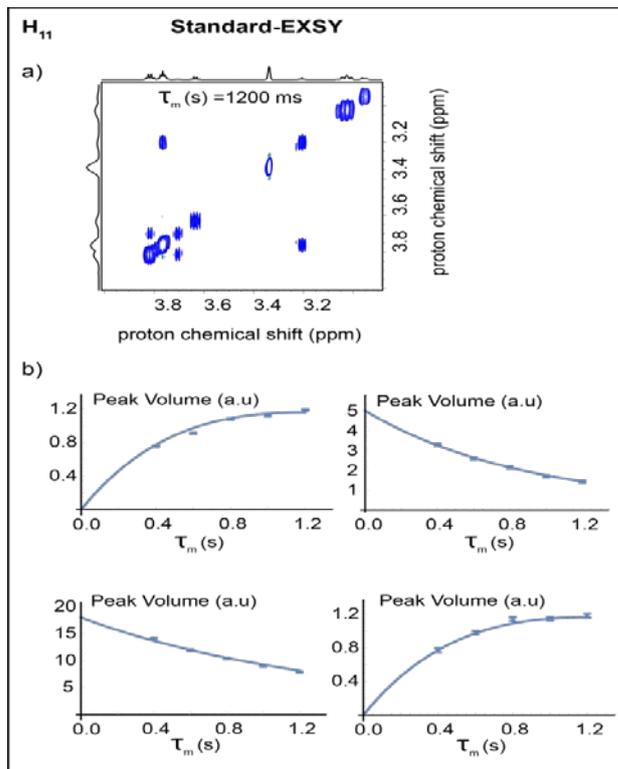


## V.D.2 H3

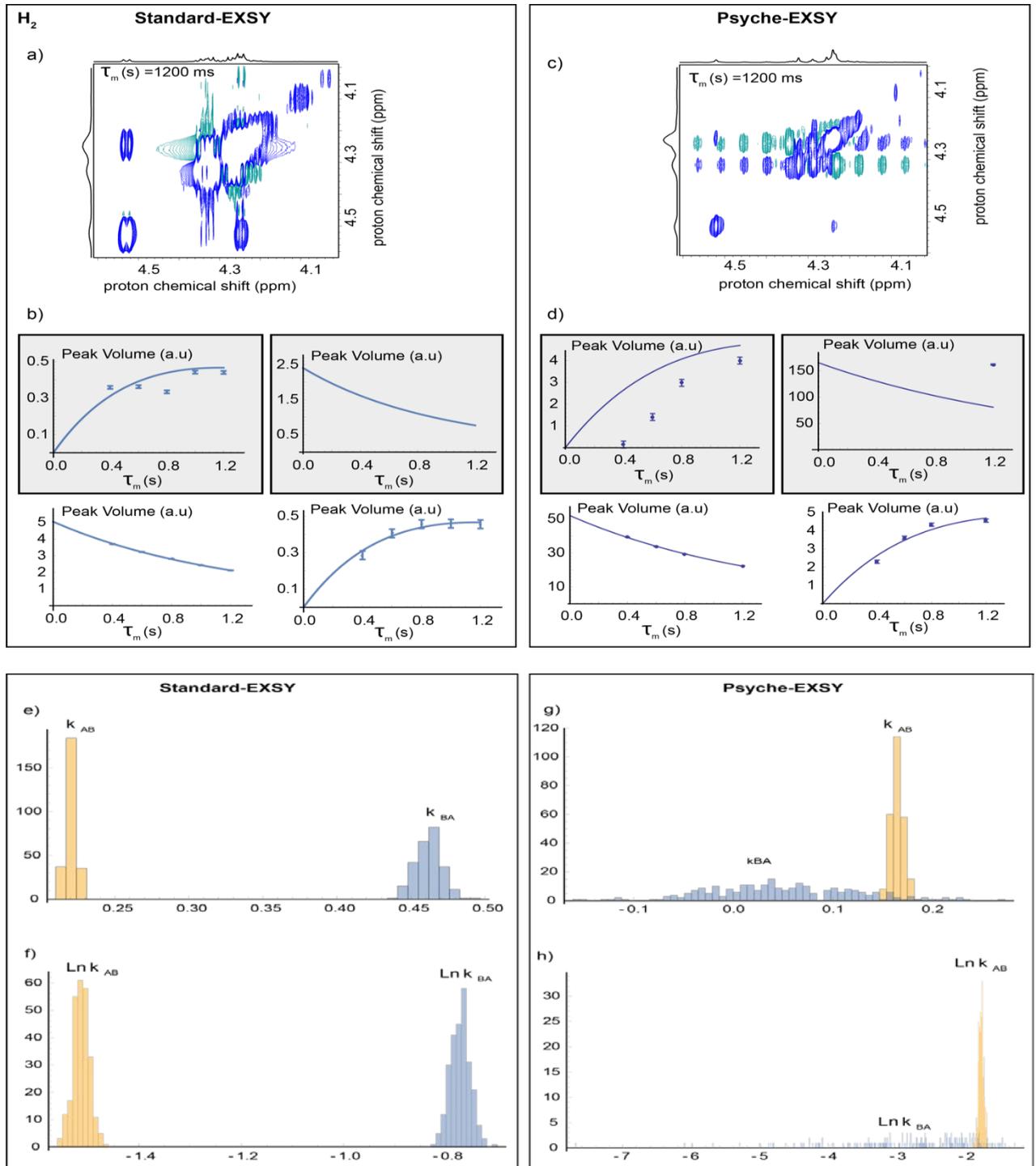


V.D.3 H<sup>7</sup>

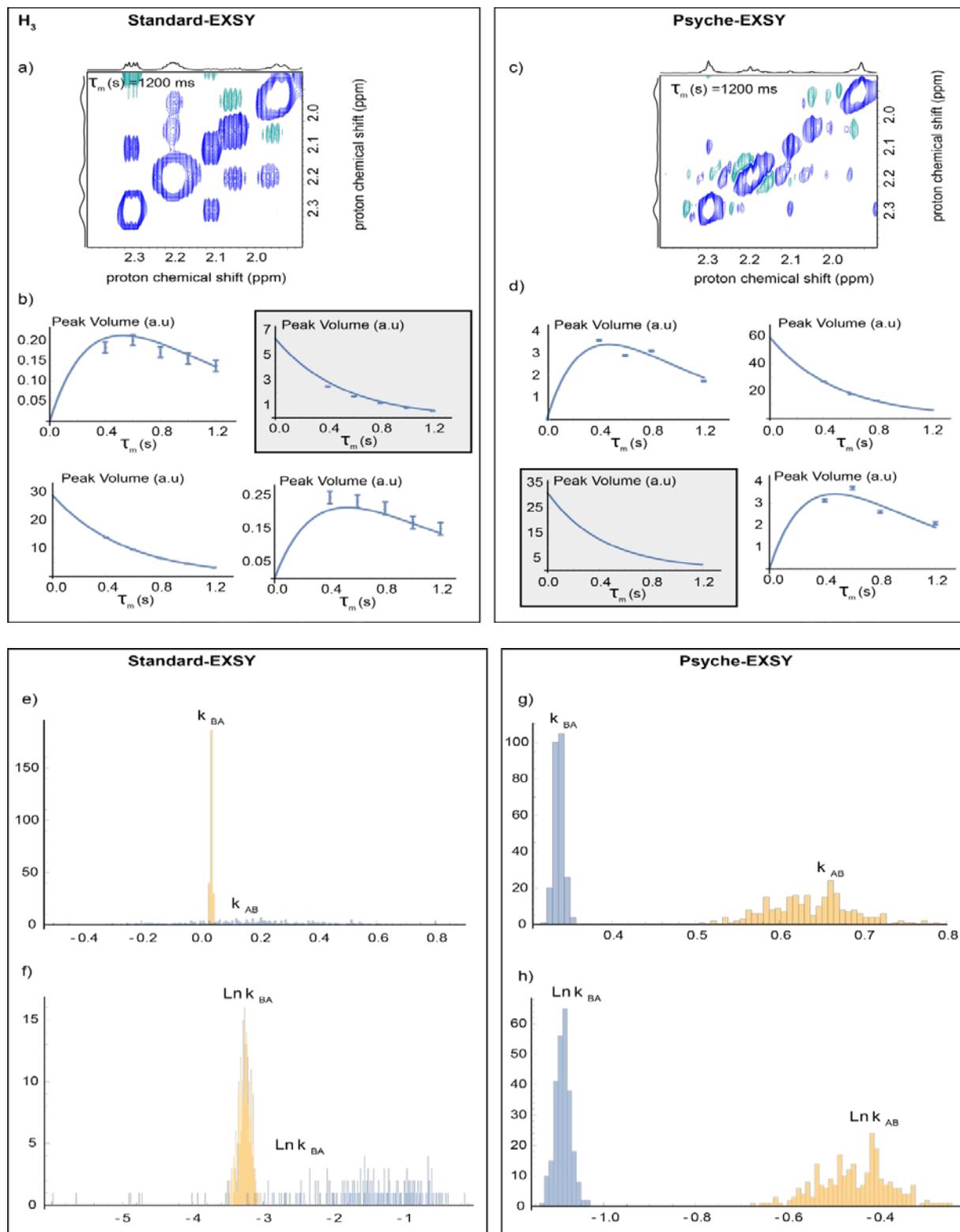
## V.D.4 H11

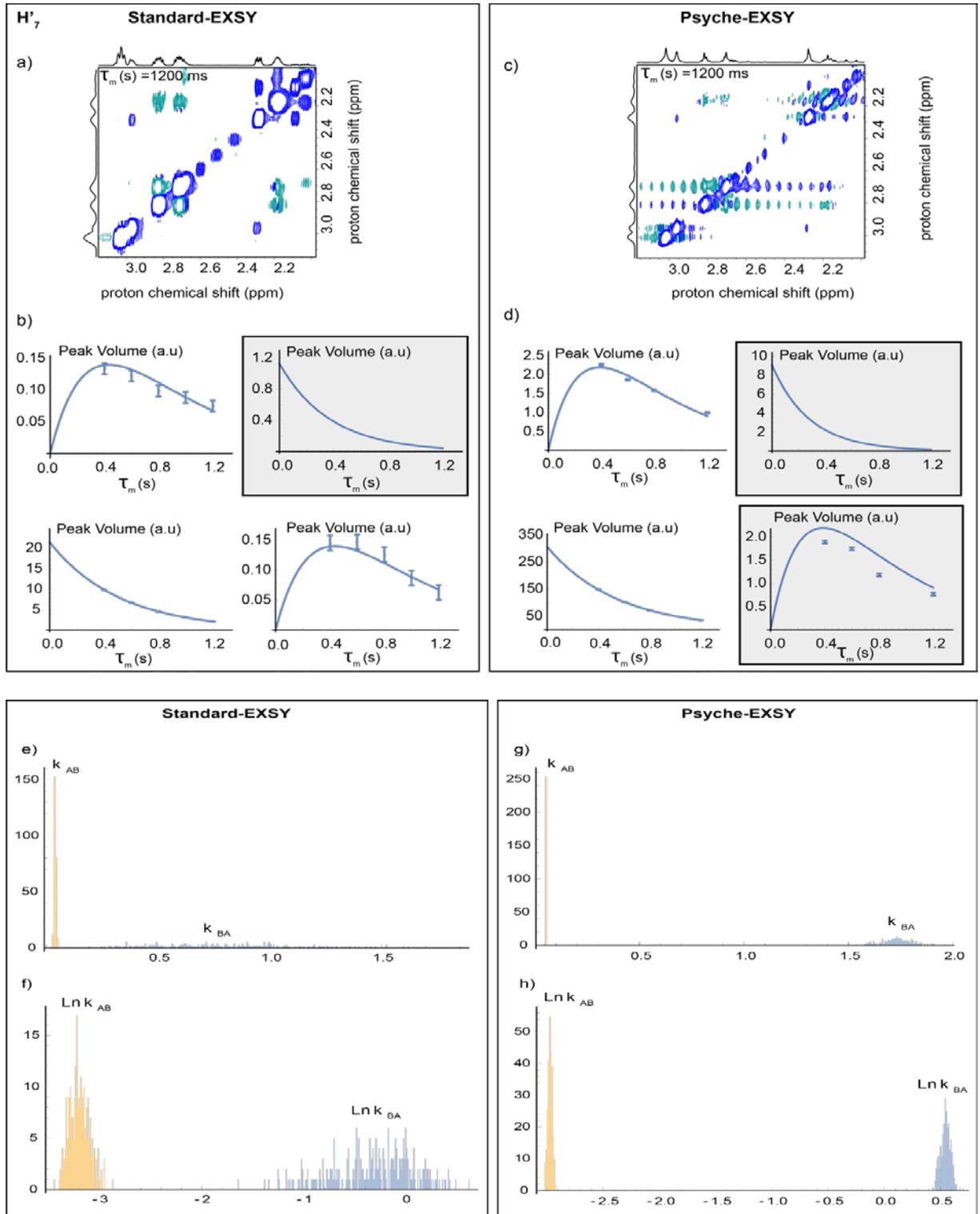


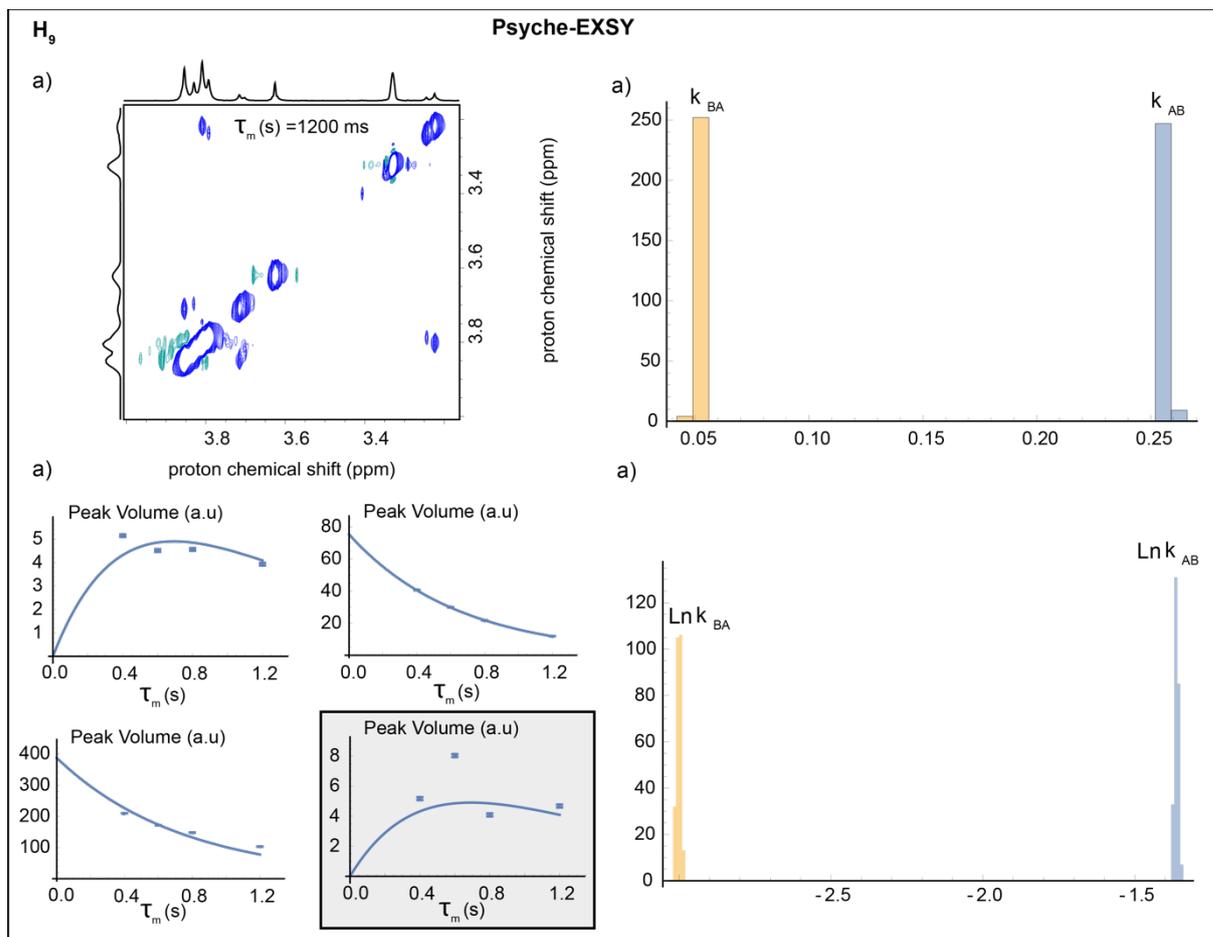
## V.E Spectre EXSY enregistrés à 280 K

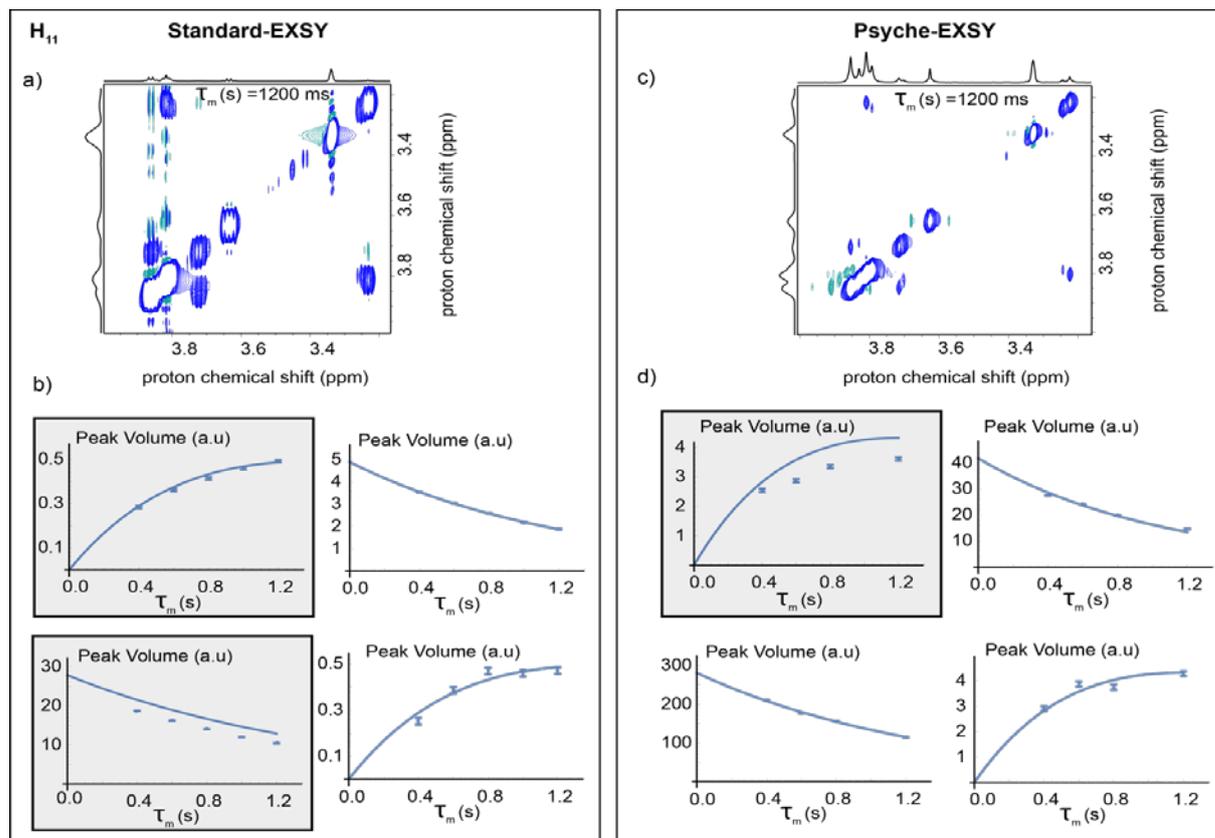
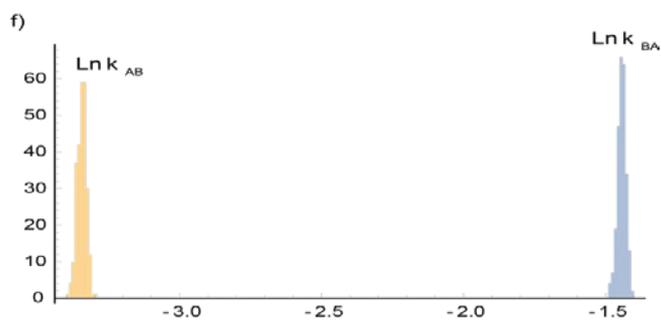
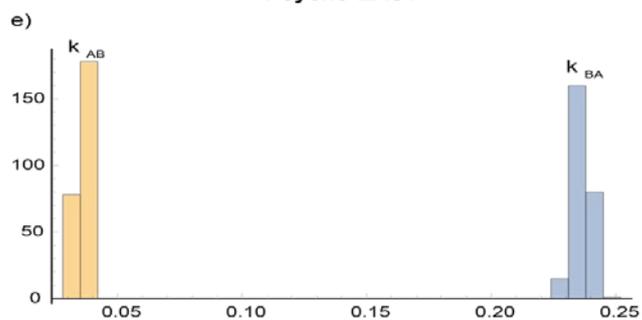
V.E.1 H<sub>2</sub>

## V.E.2 H3



V.E.3  $H'_7$ 



**Psyche-EXSY**

## VI. Analyse des paramètres d'échange et de relaxation.

Cette section présente la distribution des  $k_{AB}$  et  $k_{BA}$ ,  $T_1$ ,  $A_0$ ,  $B_0$  qui ont été déterminés pour les différents sites de protons dans le Trandolapril, ainsi que l'écart type estimé par la simulation de Monte Carlo.

### VI.A EXSY standard

T=320 K	$k_{AB}$ (s <sup>-1</sup> )	$k_{BA}$ (s <sup>-1</sup> )	$T_1$ (s)	$K_{AB}=k_{AB}/k_{BA}$
H2	8.8 ± 0.6	4.7 ± 0.3	1.790 ± 0.008	1.874
H3	7.8 ± 0.5	2.3 ± 0.1	0.897 ± 0.004	3.378
H'3	5.4 ± 0.1	4.13 ± 0.07	1.037 ± 0.004	1.318
H3a				
H6	4.7 ± 0.4	1.2 ± 0.1	0.835 ± 0.004	3.817
H7	3.97 ± 0.08	3.02 ± 0.05	0.849 ± 0.004	1.314
H'7	5.96 ± 0.06	3.06 ± 0.03	0.737 ± 0.002	1.947
H7a				
H9				
H11	8.1 ± 0.3	4.4 ± 0.1	2.38 ± 0.01	1.816
H12	6.3 ± 6.4	1.1 ± 1.1	0.791 ± 0.008	5.559
H'12				



<b>T=310 K</b>	<b><math>k_{AB}</math> (s<sup>-1</sup>)</b>	<b><math>k_{BA}</math> (s<sup>-1</sup>)</b>	<b><math>T_1</math> (s)</b>	<b><math>K_{AB}=k_{AB}/k_{BA}</math></b>
<b>H2</b>	4.02 ± 0.07	1.82 ± 0.04	1.58 ± 0.02	2.204
<b>H3</b>	4.2 ± 0.2	1.59 ± 0.07	0.81 ± 0.01	2.637
<b>H'3</b>	3.4 ± 0.6	1.9 ± 0.3	1.007 ± 0.037	1.758
<b>H3a</b>	2.8 ± 0.4	1.2 ± 0.1	1.07 ± 0.07	2.198
<b>H6</b>	4.5 ± *	0.94 ± *	0.71 ± 0.02	4.830
<b>H7</b>	6.40 ± *	1.3 ± *	0.7 ± 0.1	4.807
<b>H'7</b>	4.4 ± 0.3	1.64 ± 0.09	0.65 ± 0.01	2.683
<b>H7a</b>				
<b>H9</b>				
<b>H11</b>	4.2 ± 0.1	1.71 ± 0.06	2.14 ± 0.07	2.462
<b>H12</b>	3.1 ± 0.6	0.62 ± 0.09	0.71 ± 0.01	4.989

T=300 K	$k_{AB} (s^{-1})$	$k_{BA} (s^{-1})$	$T_1 (s)$	$K_{AB}=k_{AB}/k_{BA}$
H2	$1.51 \pm 0.01$	$0.66 \pm 0.01$	$1.48 \pm 0.01$	2.269
H3	$1.35 \pm 0.01$	$0.564 \pm 0.003$	$0.666 \pm 0.004$	2.404
H'3	$1.92 \pm 0.09$	$1.3 \pm 0.1$	$0.77 \pm 0.02$	1.438
H3a	$1.1 \pm 0.1$	$0.50 \pm 0.02$	$0.91 \pm 0.01$	2.331
H6	$2.0 \pm 0.1$	$0.28 \pm 0.01$	$0.612 \pm 0.004$	7.113
H7	$1.96 \pm 0.04$	$0.80 \pm 0.05$	$0.67 \pm 0.01$	2.433
H'7	$2.40 \pm 0.05$	$0.520 \pm 0.007$	$0.635 \pm 0.004$	4.631
H7a				
H9	$2.1 \pm 0.2$	$0.30 \pm 0.02$	$1.17 \pm 0.05$	7.151
H11	$1.34 \pm 0.01$	$0.460 \pm 0.003$	$1.505 \pm 0.005$	2.911
H12	$1.8 \pm 0.3$	$0.61 \pm 0.06$	$0.66 \pm 0.01$	2.981
H'12				

T=290 K	$k_{AB} (s^{-1})$	$k_{BA} (s^{-1})$	$T_1 (s)$	$K_{AB}=k_{AB}/k_{BA}$
H2	$0.49 \pm 0.01$	$0.114 \pm 0.003$	$1.43 \pm 0.07$	4.311
H3	$0.3 \pm 0.1$	$0.126 \pm 0.009$	$0.59 \pm 0.01$	2.759
H'3				
H3a				
H6	$0.8 \pm *$	$0.1 \pm *$	$0.55 \pm 0.06$	8.037
H7	$1.3 \pm 0.5$	$0.22 \pm 0.03$	$0.59 \pm 0.01$	6.322
H'7	$0.6 \pm 0.1$	$0.120 \pm 0.005$	$0.55 \pm 0.01$	5.375
H7a				
H9	$0.81 \pm 0.04$	$0.2 \pm 0.1$	$0.91 \pm 0.03$	3.488
H11	$0.546 \pm 0.005$	$0.153 \pm 0.001$	$1.82 \pm 0.04$	3.569
H12	$0.569 \pm *$	$0.5 \pm *$	$0.78 \pm 0.07$	1.132
H'12				

T=280 K	$k_{AB} (s^{-1})$	$k_{BA} (s^{-1})$	$T_1 (s)$	$K_{AB}=k_{AB}/k_{BA}$
H2	$0.462 \pm 0.009$	$0.220 \pm 0.003$	$1.80 \pm 0.09$	2.098
H3	$0.159 \pm 0.007$	$0.031 \pm 0.001$	$0.71 \pm 0.05$	5.115
H'3				
H3a				
H6				
H7	$0.7 \pm 0.1$	$0.045 \pm 0.002$	$0.543 \pm 0.002$	15.778
H'7	$0.7 \pm 0.3$	$0.041 \pm 0.004$	$0.523 \pm 0.007$	18.772
H7a				
H9				
H11	$0.197 \pm 0.008$	$0.03 \pm 0.07$	$1.64 \pm 0.05$	5.691
H12				
H'12				

### VI.B EXSY pure shift (Psyche)

T=320K	$k_{AB} (s^{-1})$	$k_{BA} (s^{-1})$	$T_1 (s)$	$K_{AB}=k_{AB}/k_{BA}$
H2	$6.01 \pm 0.53$	$2.4 \pm 0.2$	$1.69 \pm 0.06$	2.463
H3	$8.5 \pm 0.9$	$2.7 \pm 0.2$	$0.862 \pm 0.003$	3.101
H'3	$2.5 \pm 0.3$	$0.95 \pm 0.08$	$1.29 \pm 0.07$	2.700
H3a	$2.9 \pm 0.3$	$1.4 \pm 0.1$	$1.35 \pm 0.04$	2.072
H6	$4.007 \pm 0.481$	$2.1 \pm 0.2$	$0.79 \pm 0.01$	1.854
H7	$4.978 \pm *$	$3.5 \pm *$	$0.85 \pm 0.06$	1.395
H'7	$6.2 \pm 0.3$	$3.1 \pm 0.1$	$0.713 \pm 0.004$	1.999
H7a				
H9				
H11	$9.4 \pm *$	$5.3 \pm *$	$2.04 \pm *$	1.777
H12	$7.2 \pm *$	$3.2 \pm *$	$0.85 \pm 0.05$	2.197

T=310K	$k_{AB} (s^{-1})$	$k_{BA} (s^{-1})$	$T_1 (s)$	$K_{AB}=k_{AB}/k_{BA}$
H2	$4.1 \pm 0.2$	$1.7 \pm 0.1$	$1.86 \pm 0.09$	2.440
H3	$3.4 \pm 0.3$	$1.2 \pm 0.1$	$0.86 \pm 0.02$	2.886
H'3	$2.9 \pm 0.2$	$1.1 \pm 0.2$	$0.72 \pm 0.05$	2.499
H3a	$1.6 \pm 0.1$	$0.78 \pm 0.04$	$1.19 \pm 0.04$	2.093
H6	$2.2 \pm 0.1$	$0.47 \pm 0.02$	$0.74 \pm 0.01$	4.695
H7	$3.6 \pm 0.3$	$1.7 \pm 0.2$	$0.86 \pm 0.05$	2.028
H'7	$3.9 \pm 0.3$	$1.6 \pm 0.2$	$0.69 \pm 0.02$	2.414
H7a				
H9				
H11	$4.32 \pm 0.07$	$1.61 \pm 0.04$	$2.68 \pm 0.07$	2.677
H12	$3.2 \pm 0.4$	$0.64 \pm 0.05$	$0.83 \pm 0.03$	5.099
H'12	$2.44 \pm 0.08$	$1.9 \pm 0.1$	$0.92 \pm 0.02$	1.269

T=300K	$k_{AB} (s^{-1})$	$k_{BA} (s^{-1})$	$T_1 (s)$	$K_{AB}=k_{AB}/k_{BA}$
H2	$1.44 \pm 0.03$	$0.59 \pm 0.06$	$1.49 \pm 0.05$	2.44
H3	$1.020 \pm 0.006$	$0.402 \pm 0.002$	$0.697 \pm 0.006$	2.539
H'3	$1.82 \pm 0.08$	$0.38 \pm 0.02$	$0.64 \pm 0.05$	4.789
H3a	$1.2 \pm 0.3$	$0.32 \pm 0.03$	$0.88 \pm 0.03$	3.75
H6	$2.9 \pm 0.1$	$0.91 \pm 0.02$	$0.596 \pm 0.005$	3.186
H7	$1.18 \pm 0.01$	$0.331 \pm 0.005$	$0.64 \pm 0.01$	3.564
H'7	$2.4 \pm 0.2$	$0.501 \pm 0.023$	$0.62 \pm 0.01$	4.790
H7a				
H9	$2.1 \pm 0.2$	$0.51 \pm 0.02$	$1.13 \pm 0.03$	4.117
H11	$1.54 \pm 0.02$	$0.56 \pm 0.03$	$1.79 \pm 0.05$	2.2.75
H12	$1.10 \pm 0.04$	$0.9 \pm 0.1$	$0.72 \pm 0.01$	1.222
H'12	$0.84 \pm 0.01$	$0.75 \pm 0.03$	$0.766 \pm 0.004$	1.12



T=290K	$k_{AB} (s^{-1})$	$k_{BA} (s^{-1})$	$T_1 (s)$	$K_{AB}=k_{AB}/k_{BA}$
H2	0.75 ± 0.03	0.61 ± 0.01	1.44 ± 0.01	1.234
H3	0.63 ± 0.02	0.34 ± 0.08	0.654 ± 0.008	1.809
H'3	0.61 ± 0.02	0.02 ± 0.09	0.59 ± 0.02	29.050
H3a	0.3 ± 0.2	0.15 ± 0.01	0.83 ± 0.01	2.511
H6	1.1 ± 0.3	0.20 ± 0.01	0.548 ± 0.008	5.800
H7	0.68 ± 0.04	0.3 ± 0.1	0.60 ± 0.01	1.771
H'7	1.1 ± 0.1	0.160 ± 0.005	0.565 ± 0.005	7.196
H7a				
H9	0.667 ± 0.005	0.178 ± 0.001	1.20 ± 0.01	3.752
H11	0.634 ± 0.004	0.153 ± 0.001	1.74 ± 0.03	4.152
H12				
H'12				

T=280K	$k_{AB} (s^{-1})$	$k_{BA} (s^{-1})$	$T_1 (s)$	$K_{AB}=k_{AB}/k_{BA}$
H2	0.165 ± 0.005	0.04 ± 0.06	1.81 ± 0.02	3.501
H3	0.63 ± 0.05	0.336 ± 0.006	0.601 ± 0.003	1.898
H'3				
H3a				
H6				
H7				
H'7	1.73 ± 0.07	0.051 ± 0.001	0.559 ± 0.002	33.805
H7a				
H9	0.256 ± 0.002	0.05000 ± 0.0006	0.773 ± 0.007	5.149
H11	0.236 ± 0.003	0.035 ± 0.001	1.40 ± 0.03	6.701
H12				
H'12				

## VI.C Distributions des vitesses d'échange

Evolution des  $k_{AB}$  et  $k_{BA}$  pour les différents sites de protons dans le Trandolapril étudié par l'analyse d'EXSY standard (bleu) et EXSY psyche (rouge). Les barres d'erreur correspondent à 2 fois l'écart type indiqué ci-dessus. Les astérisques correspondent aux protons pour lesquels  $\sigma$  était très grand.

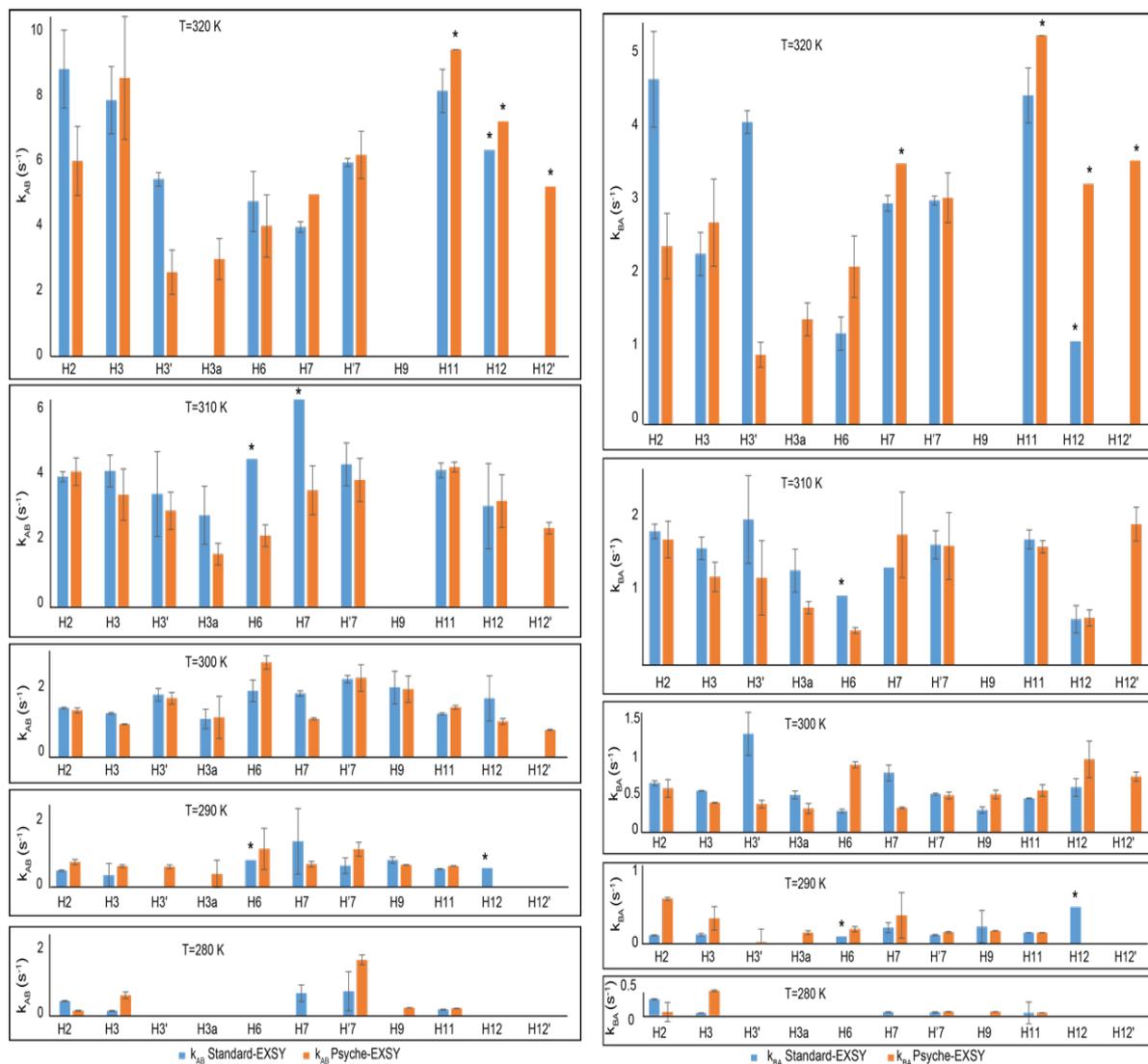
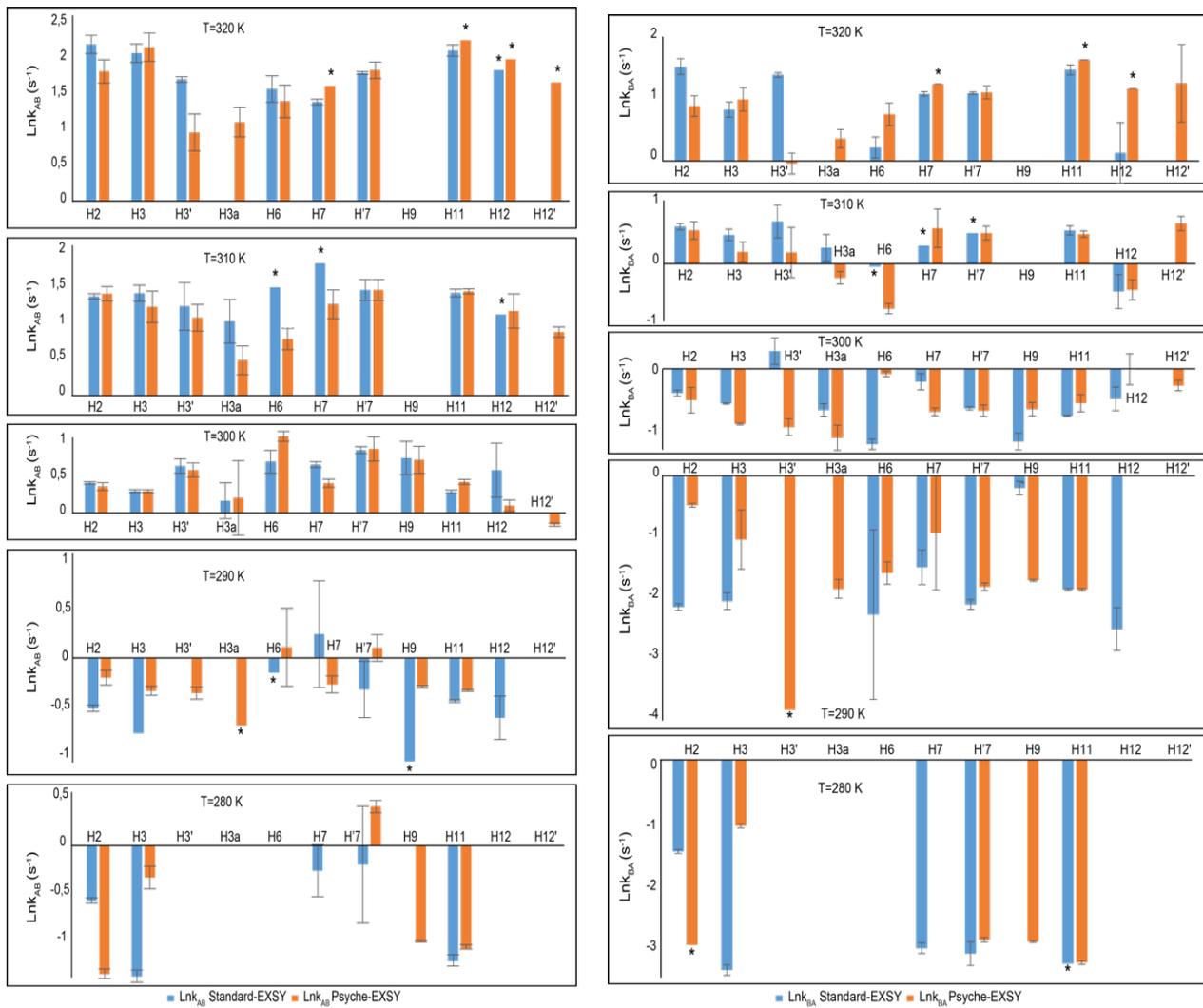


Figure S1. Diagrammes des  $k_{AB}$  et  $k_{BA}$  extraits pour les différents sites de protons à 5 températures différentes de 280 à 320 K (EXSY standard-EXSY Psyche).





**Figure S2. Diagrammes des  $k_{AB}$  et  $k_{BA}$  extraits pour les différents sites de protons à 5 températures différentes de 280 à 320 K (EXSY standard-EXSY Psyche).**

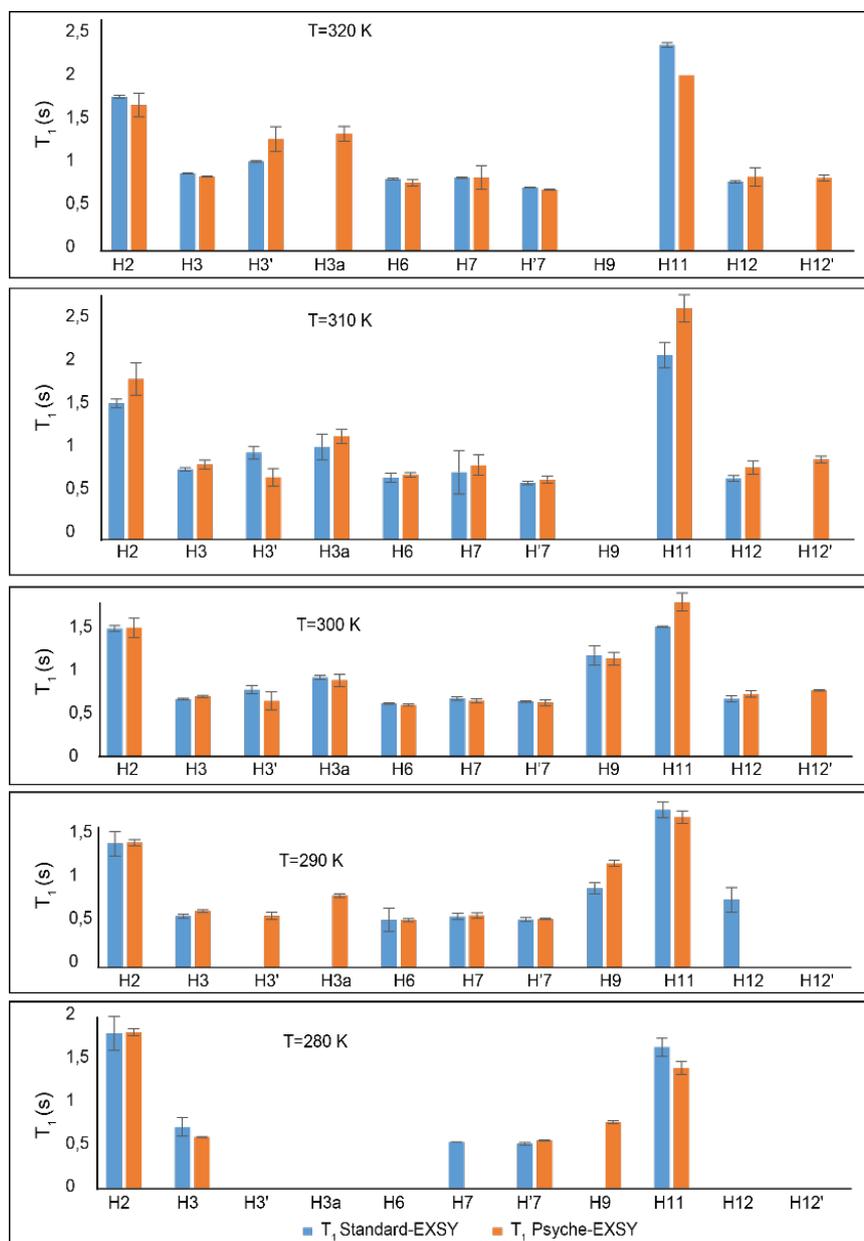


Figure S3. Diagrammes T<sub>1</sub> extraits pour les différents sites de protons à 5 températures différentes de 280 à 320 K (EXSY standard-EXSY Psyche).

## VII. PSYCHE EXSY Pulse Sequence

```
; This pulse program is intended as a guideline only. It is part of
; G. Aloui, S. Bouabdallah, J.P. Baltaze, J.E. Herbert Pucheta, S. Touil, J. Farjon and N. Giraud*
; "Monitoring Conformational Changes in an Enzyme Conversion Inhibitor Using Pure Shift Exchange NMR Spectroscopy"
; Manuscript in preparation
```

```
;The authors do not provide any guarantee as to the usability of the program.
;Use of this program may lead to serious damage to your spectrometer.
;The authors are not responsible for any damage resulting from the use of this program.
;Note that all the parameters need to be properly adjusted for the program to work.
;This program may be freely copied and modified as long as the whole of this header
;is included in any copied or modified version.
```

This program is based on the pulse sequence initially coded by Ralph Adams, which is part of:

```
; L. Kaltschnee, K. Knoll, V. Schmidts, R. W. Adams,
; M. Nilsson, G. A. Morris and C. M. Thiele,
; "Extraction of Distance Restraints from Pure Shift NOE Experiments",
; Journal of Magnetic Resonance 271 (2016) 99–109,
; DOI: 10.1016/j.jmr.2016.08.007
```

```
; noesyphpsyche
; avance-version
```

```
; 2D homonuclear correlation via noe or chemical exchange.
; phase sensitive with purging gradient pulse in mixing time
; and PSYCHE element for pure shift
; The resulting 3D dataset can be restructured using the pshift macro.
```

```
;$CLASS=HighRes
;$DIM=3D
;$TYPE=
;$SUBTYPE=
;$COMMENT=
```

```
define delay DELAYNOE
define delay tauA
define delay tauB
```

```
#include <Avance.incl>
#include <Grad.incl>
```

```
"d0=0" ; set initial value of pure shift incremented delay
"in0=inf1/2" ; set pure shift chunk size
"p2=p1*2" ; 180 pulse width = 2 x 90 pulse width
"tauA=in0/2-p16-d16-50u"
"tauB=(dw*2*cnst4)+d16+50u"
```

```
"cnst50=(cnst20/360)*sqrt((2*cnst21)/(p40/2000000))"
"p30=1000000.0/(cnst50*4)"
"cnst31= (p30/p1) * (p30/p1)"
"spw40=plw1/cnst31"
```

```
"p10=p40"
```

```
; NOE delays
"DELAYNOE=d9-p17-d16-50u"
```



```

;nOesy delays
"in2=inf2" ; set nOe increment
"d2=3u" ; set initial value of nOe incremented delay

aqseq 312 ; define order of increments for 3D seq

1 ze
2 d1 pl1:f1 ; set power level in f1 channel

50u UNBLKGRAD ; gradient blanking pulse

;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;
;;; nOeSY element ;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;
;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;

3 p1 ph1 ; 90 pulse
d2 ; incremented (nOe) delay
p1 ph0 ; 90 pulse

50u UNBLKGRAD ; gradient blanking pulse

p17:gp1 ; purging gradient pulse

d16 ; gradient stabilisation delay

DELAYNOE ; NOE mixing time

p1 ph2 ; 90 pulse

;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;
;;; PSYCHE element ;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;
;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;

4 d0
tauA
50u
p16:gp2
d16
p2 ph0
50u
p16:gp2
d16
tauA
p16:gp3
d16
10u pl0:f1
tauB
( center (p40:sp40 ph3):f1 (p10:gp10) )
d16
10u pl1:f1
p16:gp3
d16
50u BLKGRAD
d0

5 go=2 ph31 ; acquisition macro
d1 mc #0 to 2 ; write data macro
F1QF(id0) ; PSYCHE loop
F2PH(ip1 & rd0, id2) ; nOe loop

```



exit

; Notes on the tables for phase cycling

;ph0 ; 2nd 90 pulse and 1st 180 pulse

;ph1 ; 1st 90 pulse

;ph2 ; 3rd 90 pulse

;ph3 ; 2nd 180 pulse (selective)

;ph31 ; receiver

; Tables for phase cycling

ph0= 0

ph1= 0 2

ph2=0 0 2 2

ph3=0 0 0 1 1 1 1

ph31= 0 2 2 0 2 0 2

; Descriptions of the acquisition parameters

; p1 : 90 degree rf pulse width

; p2 : 180 degree rf pulse width (calculated automatically)

; p12 : 180 selective pulse width

; p16 : CTP gradient pulse width (1 ms)

; p17 : purging gradient pulse width (0.5 ms)

; d0 : incremented (pure shift) delay

; d1 : relaxation delay; 1-5 \* T1

; d2 : incremented (nOe) delay

; d9 : NOESY mixing time

; d16 : gradient stabilisation delay

; p10 : f1 channel - high power level pulse off (120 dB)

; p11 : f1 channel - high power level hard pulse (default)

; p12 : f1 channel - power level for selective pulse (default)

; NS :2\*n

; DS :4\*m

; 1 td : number of PSYCHE chunks to acquire (F1)

; 2 td : number of nOe increments (F2)

; 3 td : number of datapoints in time domain (F3)

;

; 1 FnMODE: QF

; 2 FnMODE: States

; gpz1: 10 - 20% for purging pulse

; spw40 : RF power of double-chirp PSYCHE pulse element

; spnam40: file name for PSYCHE pulse element

; gpz2: CTP gradient (77%)

; gpz3: CTP gradient (49%)

; gpz10: weak gradient during PSYCHE element (1-3%)

; gpnam2: SINE.100

; gpnam3: SINE.100

; gpnam10: RECT.1

; cnst4: number of drop points

; cnst20: desired flip angle for PSYCHE pulse element (degree) (normally 10-25)

; cnst21: bandwidth of each chirp in PSYCHE pulse element (Hz) (normally 10000)



## VIII. Aperçu sur l'analyse des spectres EXSY-NUS

T=320 K	EXSY-Standard	EXSY-NUS	Les sites proton pris en compte dans le calcul de l'EA standard EXSY	Les sites proton pris en compte dans le calcul de l'EA NUS-EXSY
H2	{1, 3, 4}	{1, 3, 4}	✓	✓
H3	Superposition	Superposition		
H'3	{1, 2, 3, 4}	{1,4} Résolution	✓	✓
H3a	Superposition	Superposition		
H6	{2,3} Superposition	{2,3,4} Artefacts	✓	
H7	Superposition	{2,3} Résolution		✓
H'7	{1, 2, 3, 4}	{1, 2, 3, 4}	✓	✓
H7a	X Signaux tués par artefacts	X Signaux tués par artefacts		
H9	X Signaux tués par artefacts	X Signaux tués par artefacts		
H11	{2,3} Superposition	{2,3}Superposition		
H12	{2,3} Résolution	{2,3,4}Résolution		
H'12	X Superposition	X Superposition		

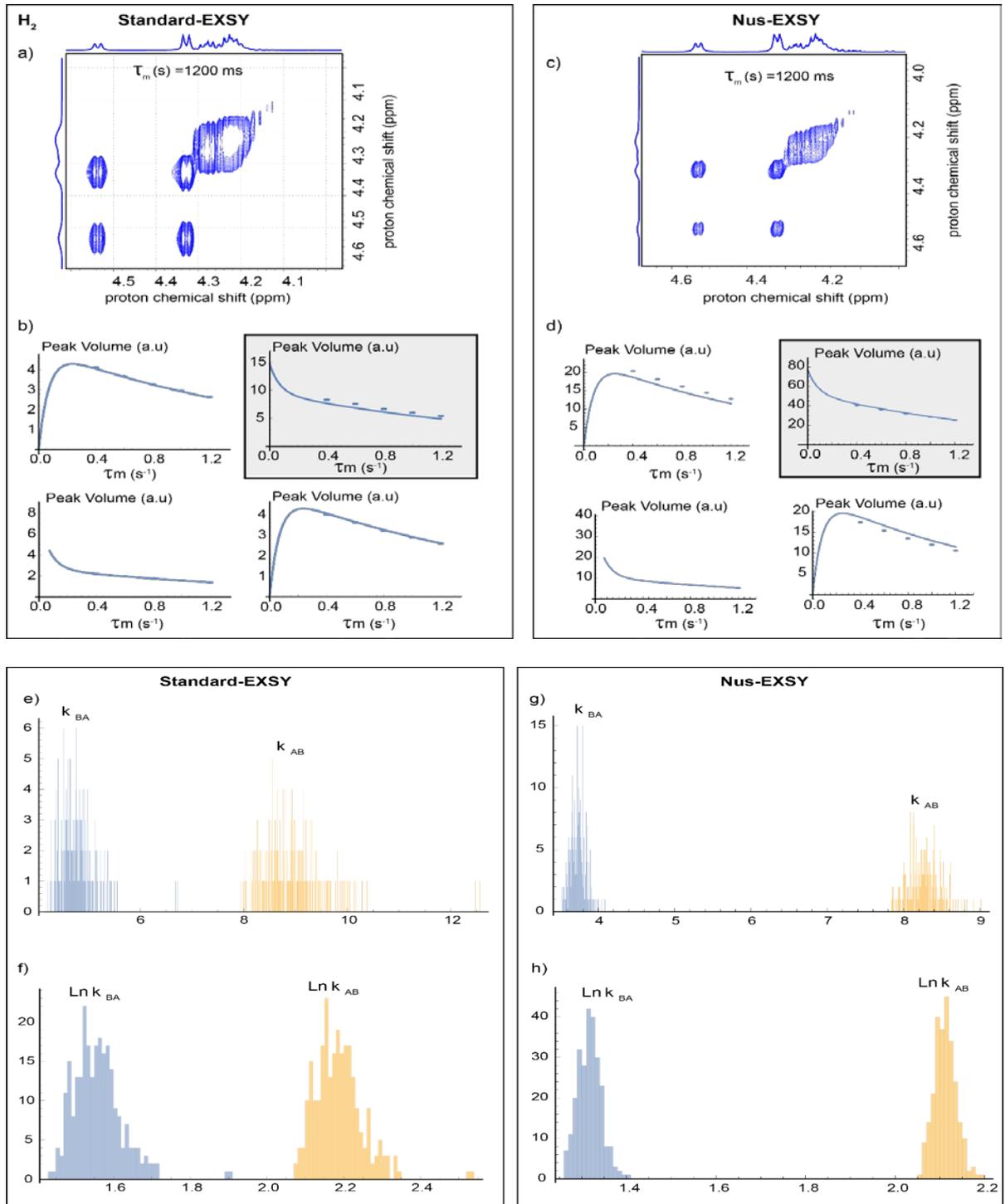
<b>T=310 K</b>	<b>EXSY- Standard</b>	<b>EXSY-NUS</b>	Les sites proton pris en compte dans le calcul de l'EA standard EXSY	Les sites proton pris en compte dans le calcul de l'EA NUS-EXSY
H2	{1, 3, 4}	{1, 4} Artefacts	✓	✓
H3	{1, 3,4}Résolution	{1,3,4}Superposition	✓	✓
H'3	{2, 3} Superposition	{2,3} Résolution	✓	
H3a	{2, 3} Superposition	{2,3} Artefacts	✓	✓
H6	{2, 3} Superposition	{2,3} Artefacts		✓
H7	{2, 3} Résolution	{2,3} Résolution		
H'7	{1, 3, 4}	{1, 3, 4}	✓	✓
H7a	X Signaux tués par artefacts	X Signaux tués par artefacts	✓	✓
H9	X Résolution	X Résolution		
H11	{1,2,3}Superposition	{2,3} Résolution		
H12	{2,3} Résolution	{2,3} Résolution	✓	✓
H'12	X Superposition	{2,3} Artefacts		

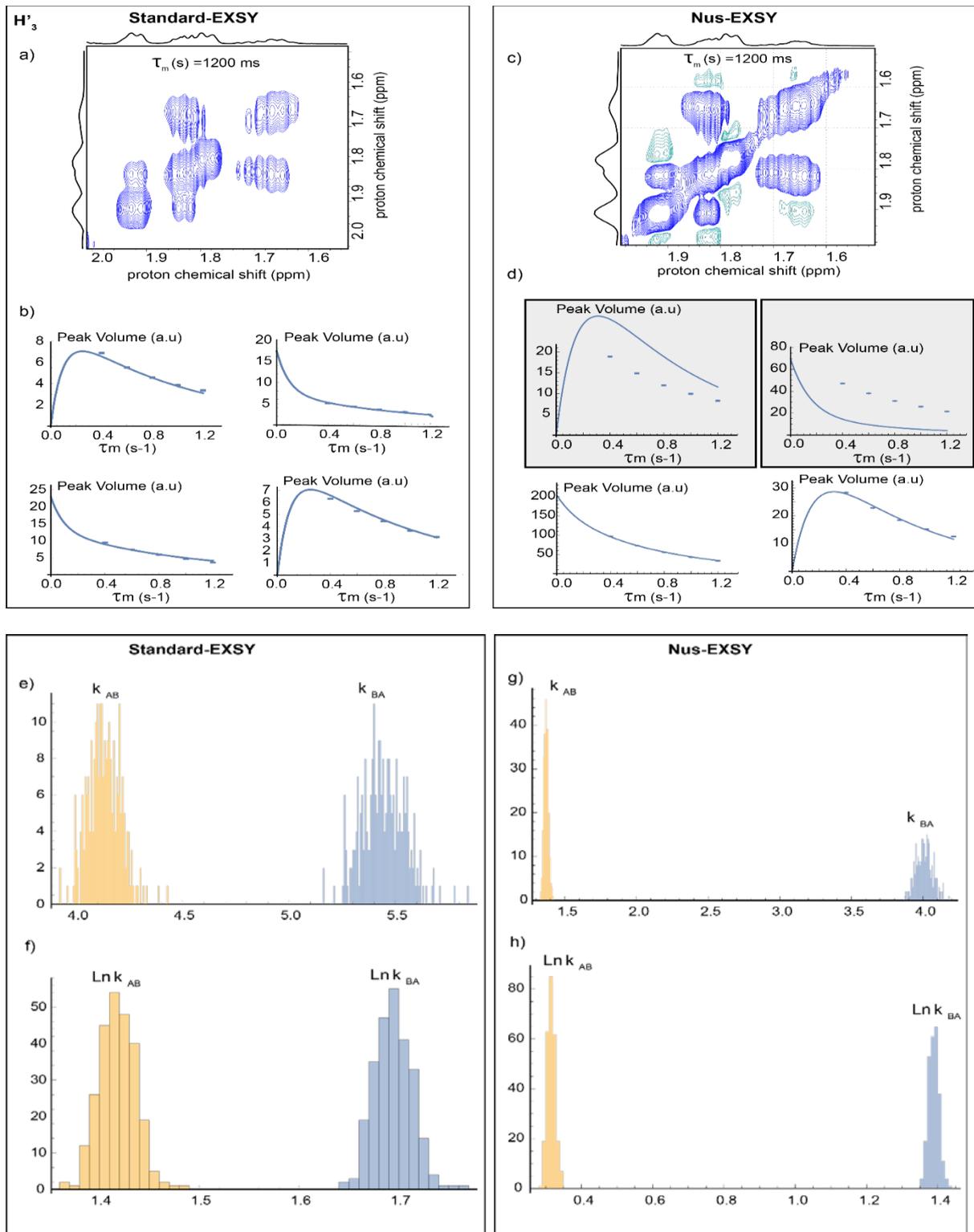
<b>T=300 K</b>	<b>EXSY- Standard</b>	<b>EXSY-NUS</b>	Les sites proton pris en compte dans le calcul de l'EA standard EXSY	Les sites proton pris en compte dans le calcul de l'EA NUS-EXSY
H2	{1, 3, 4} Artefacts	{1, 4} Artefacts	✓	✓
H3	{1, 2, 3, 4}	{2, 3} Artefacts	✓	
H'3	{2,3,4}Superposition	{2, 4} Artefacts	✓	✓
H3a	{1, 3} Superposition	X		
H6	{2, 3} Superposition	X	✓	
H7	{2, 4}	{1,2,3,4}Superposition	✓	
H7'	{1, 3, 4}	{1, 3, 4} Artefacts	✓	✓
H7a	X Signaux tués par artefacts	X Signaux tués par artefacts	✓	✓
H9	{1, 4} Superposition	{1,3,4} Superposition	✓	✓
H11	{2,3,4}Résolution	{3,2} Superposition		
H12	{1,3,4}Superposition	{2,3,4}Résolution	✓	✓
H'12	X Superposition	X Superposition		

<b>T=290 K</b>	<b>EXSY- Standard</b>	<b>EXSY-NUS</b>	Les sites proton pris en compte dans le calcul de l'EA standard EXSY	Les sites proton pris en compte dans le calcul de l'EA NUS-EXSY
H2	{1, 2, 4}	{1, 4} Artefacts	✓	✓
H3	{1,3,4}Superposition	X	✓	
H'3	X	{2, 3} Artefacts		
H3a	X	X		
H6	{2,3} Résolution	X		
H7	{1, 2, 4}	{2,3,}Résolution		
H'7	{1,3,4}Résolution	{1,3,4}Résolution	✓	✓
H7a	X Signaux tués par artefacts	X Signaux tués par artefacts	✓	
H9	{2,3} Résolution	{1,2} Résolution		
H11	{1, 2, 3, 4}	{1,2,3,4}		
H12	{1, 2, 3}	X Artefacts		
H'12	X	X Artefacts		

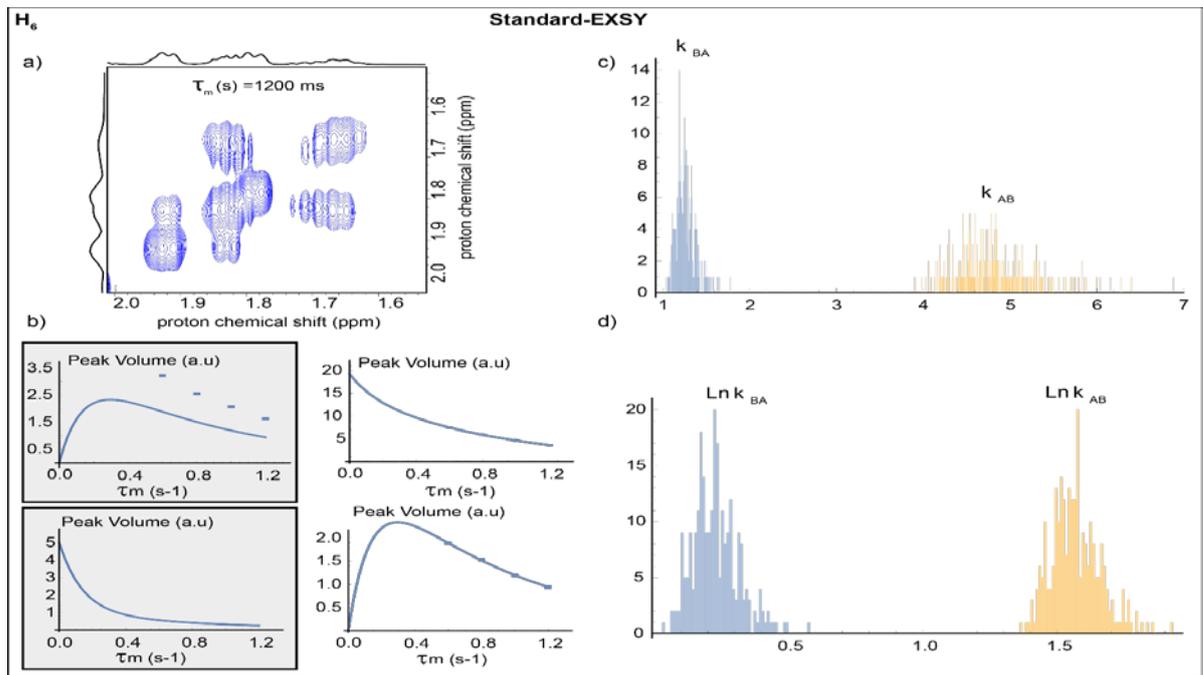
<b>T=280 K</b>	<b>EXSY-Standard</b>	<b>EXSY-NUS</b>	Les sites proton pris en compte dans le calcul de l'EA standard EXSY	Les sites proton pris en compte dans le calcul de l'EA NUS-EXSY
H2	{1, 3} Résolution	{1,3} Artefacts	✓	✓
H3	{1,3,4} Résolution	{2,3,4} Artefacts	✓	✓
H'3	X	X		
H3a	X	X		
H6	X	X		
H7	{1,4} Résolution	X		
H'7	{1, 3, 4} Résolution	{1,4} artefacts	✓	
H7a	X Signaux tués par artefacts	X Signaux tués par artefacts	✓	
H9	X	{1, 2, 4}	✓	
H11	{2,3} Rsolution	{1,2, 3}		
H12	X	X		
H'12	X	X		

## VIII.A 5 Spectre EXSY enregistrés à 320 K

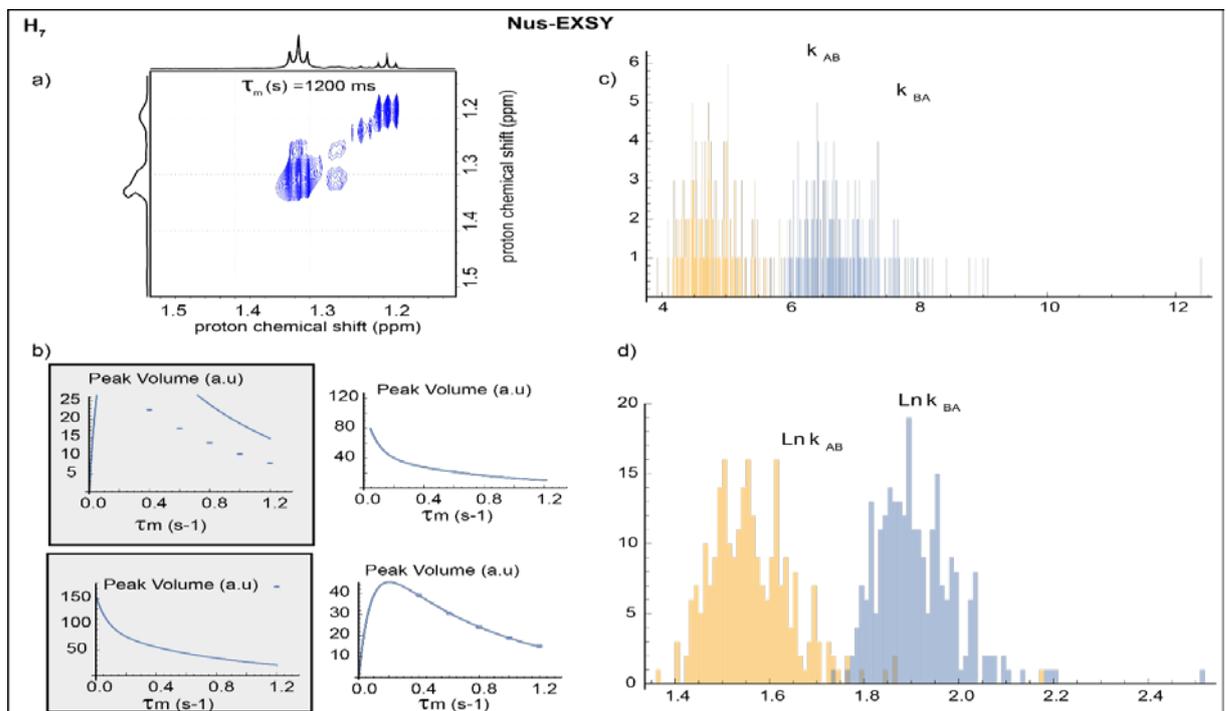
VIII.A.1 H<sub>2</sub>

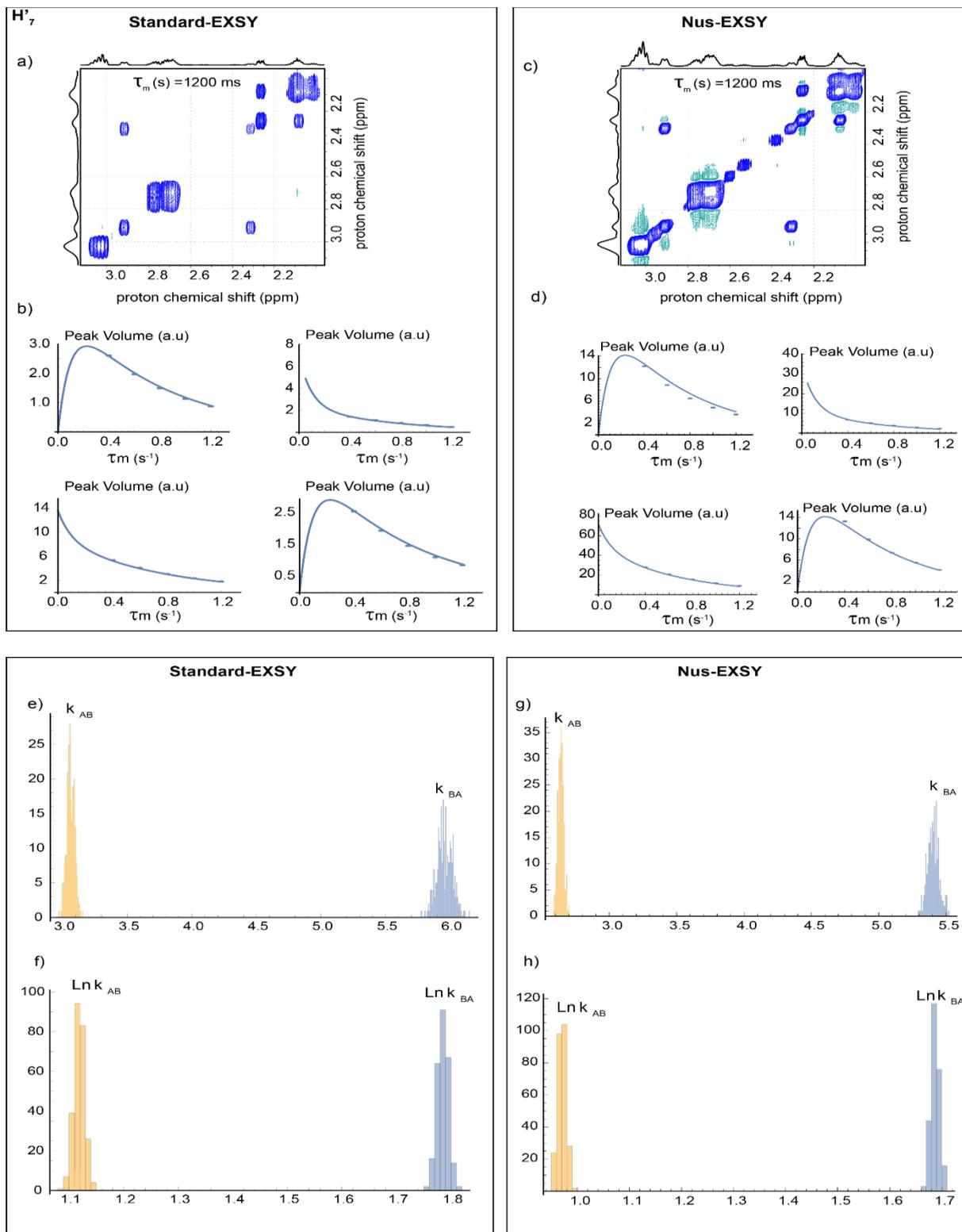
VIII.A.2  $H'_3$ 

## VIII.A.3 H6

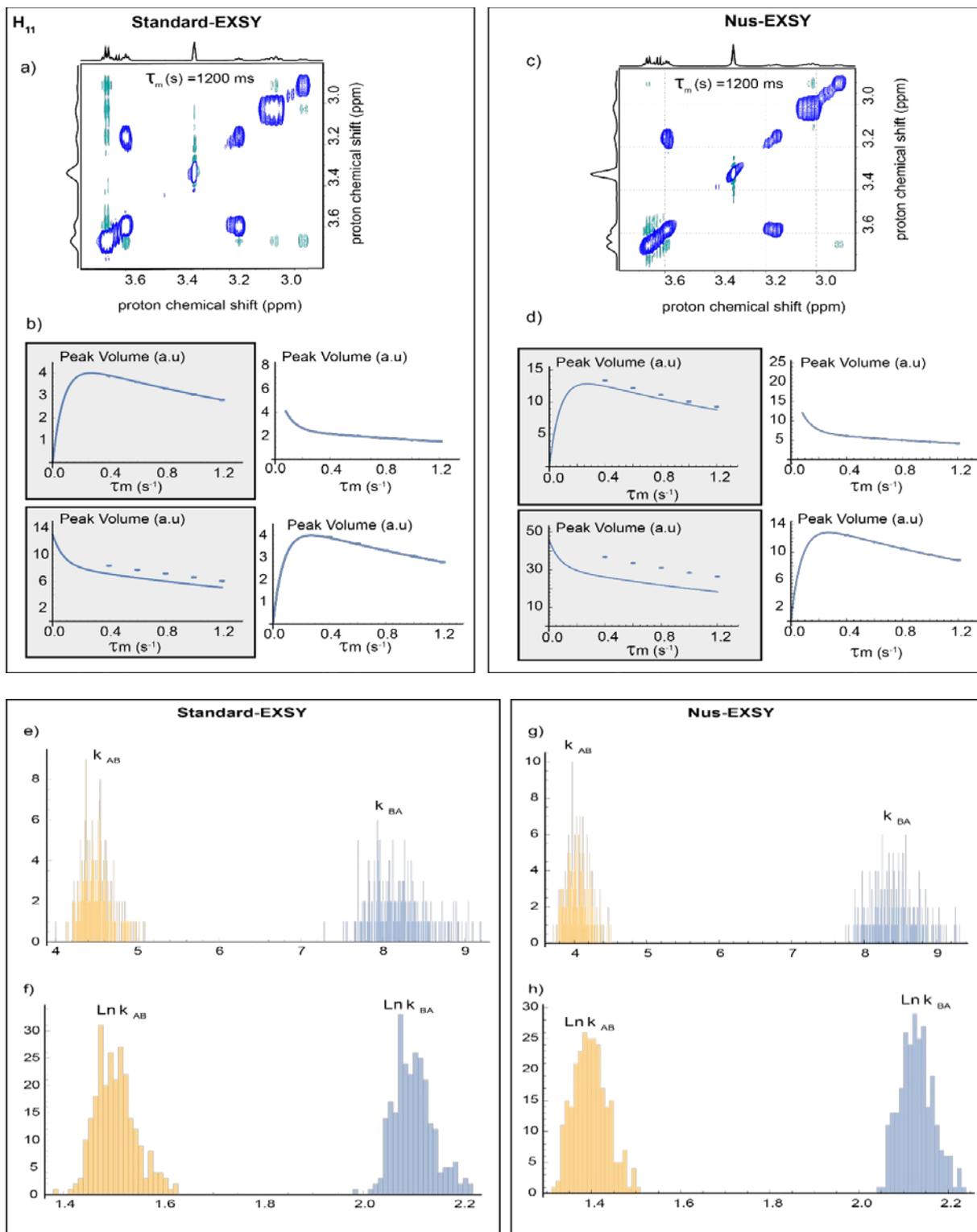


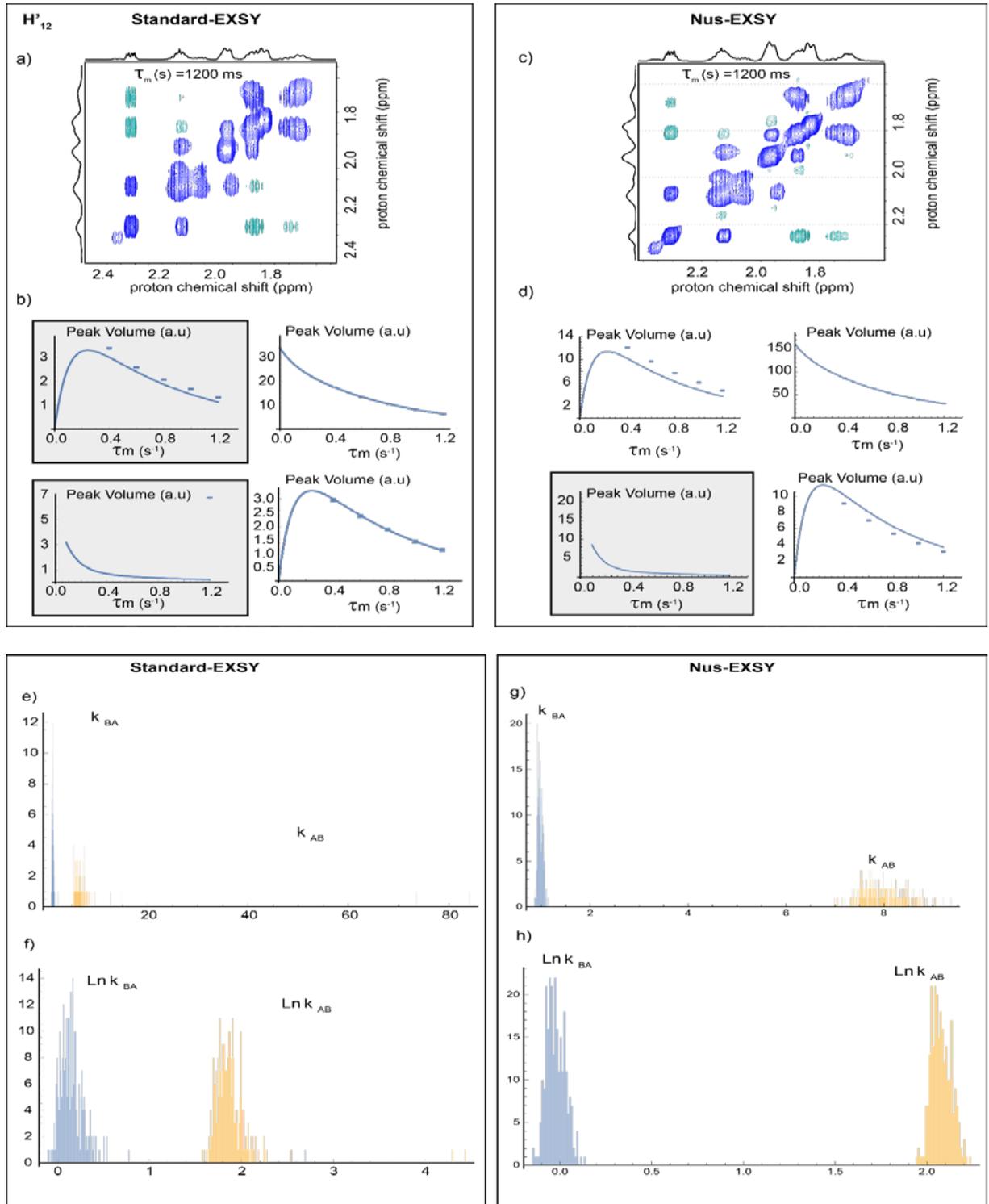
## VIII.A.4 H7



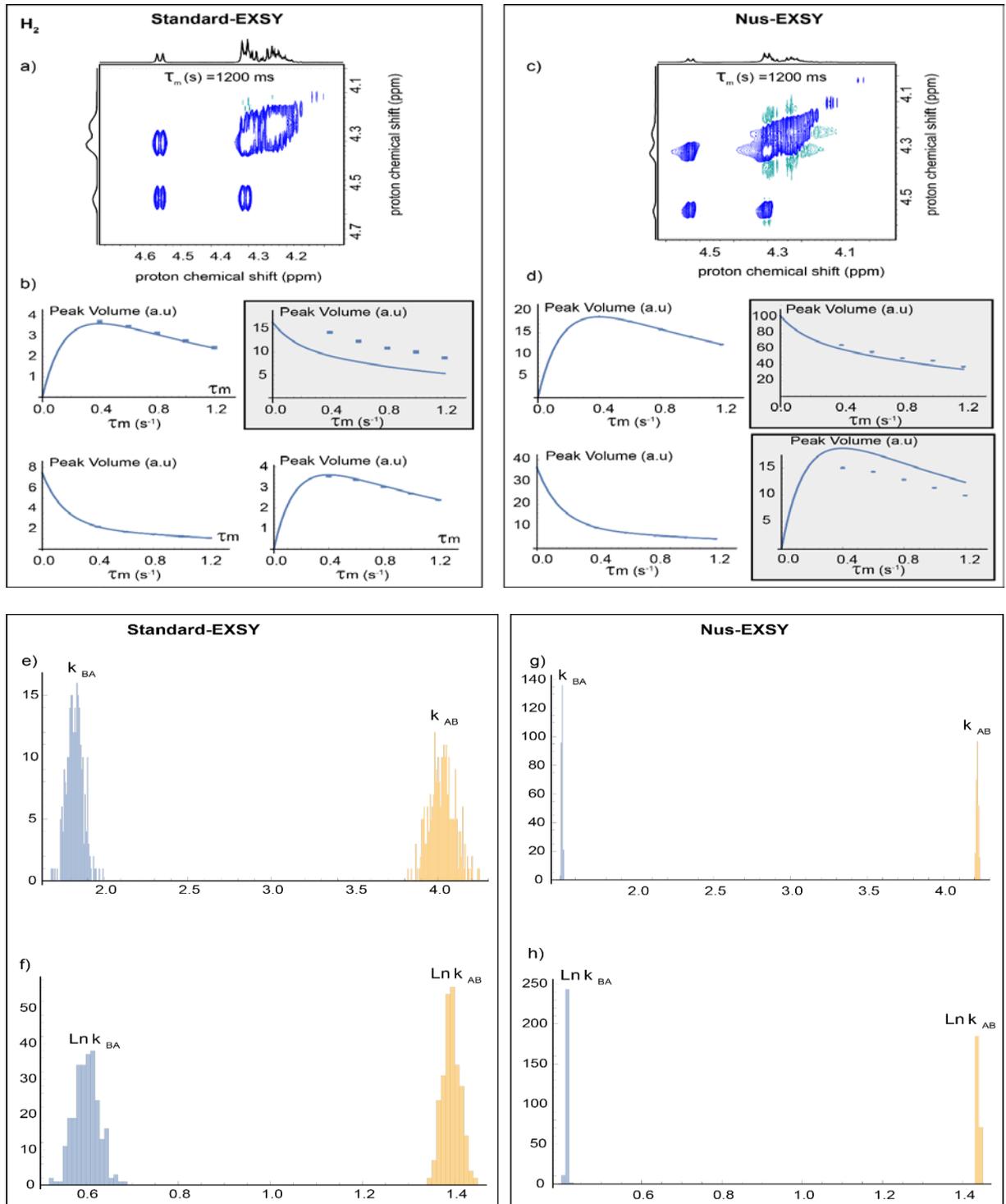
VIII.A.5 H<sup>7</sup>

## VIII.A.6 H11

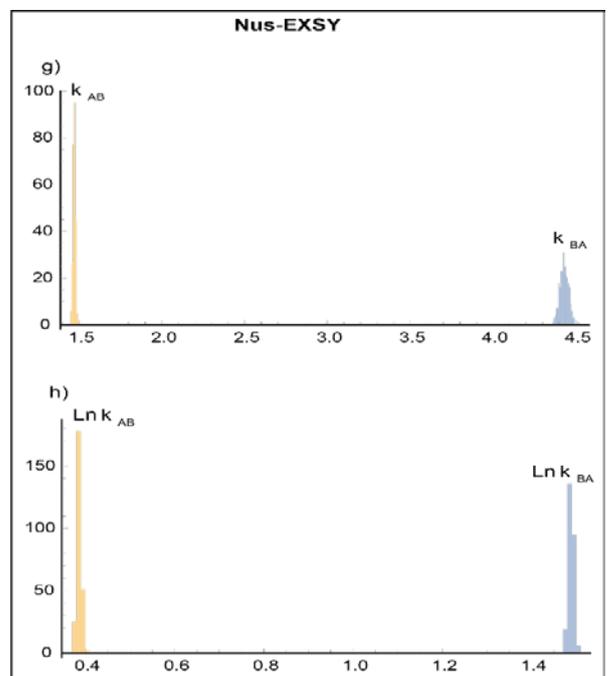
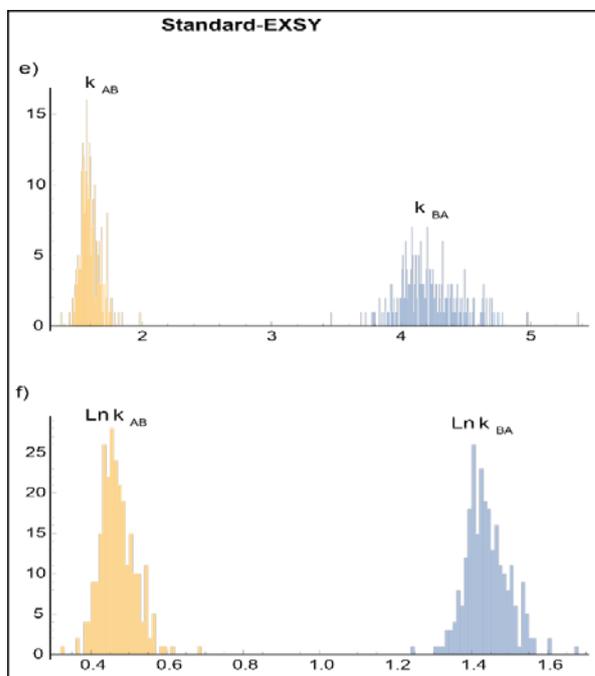
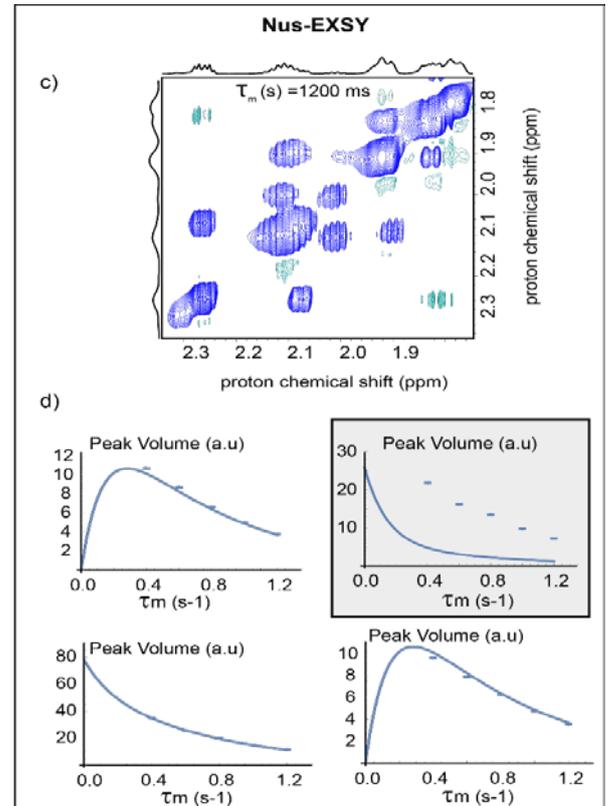
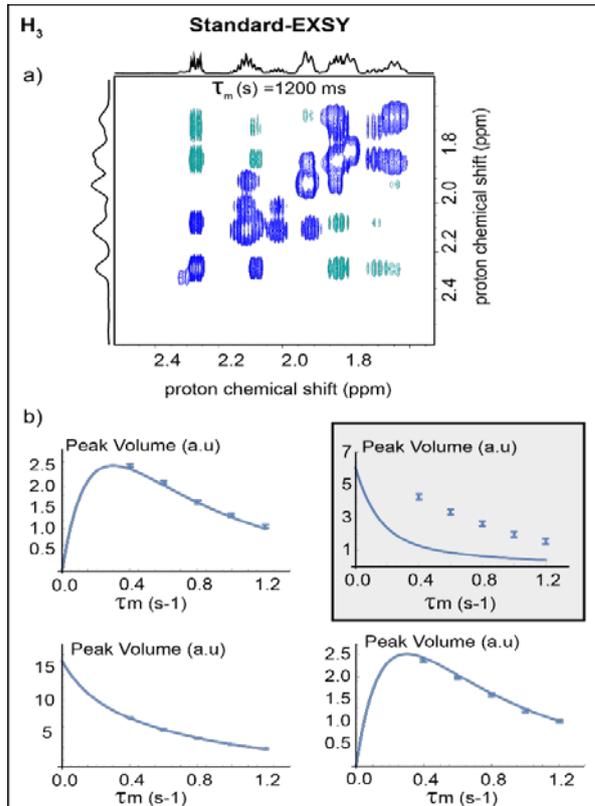


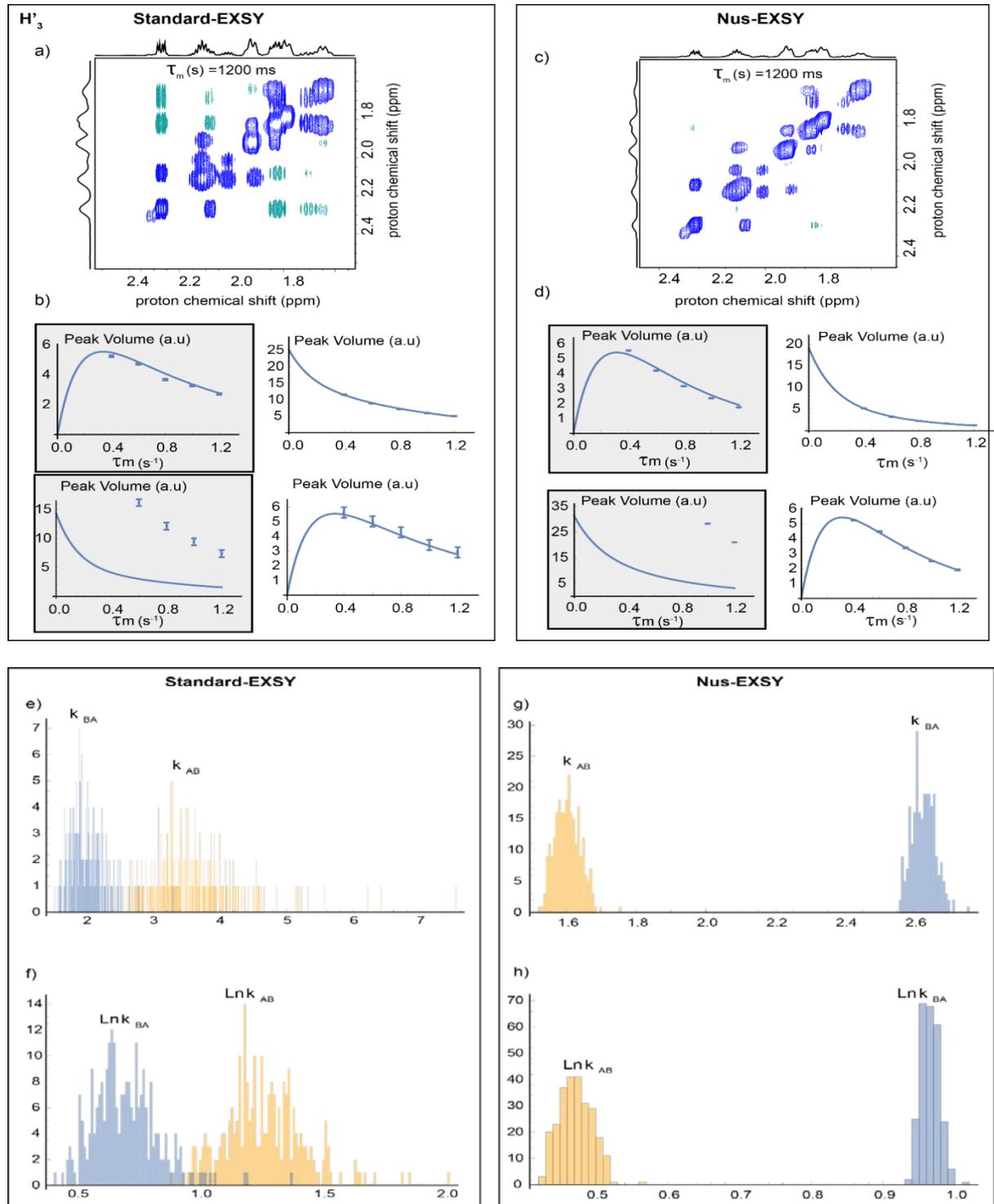
VIII.A.7 H<sup>12</sup>

## VIII.B Spectre EXSY enregistrés à 310 K

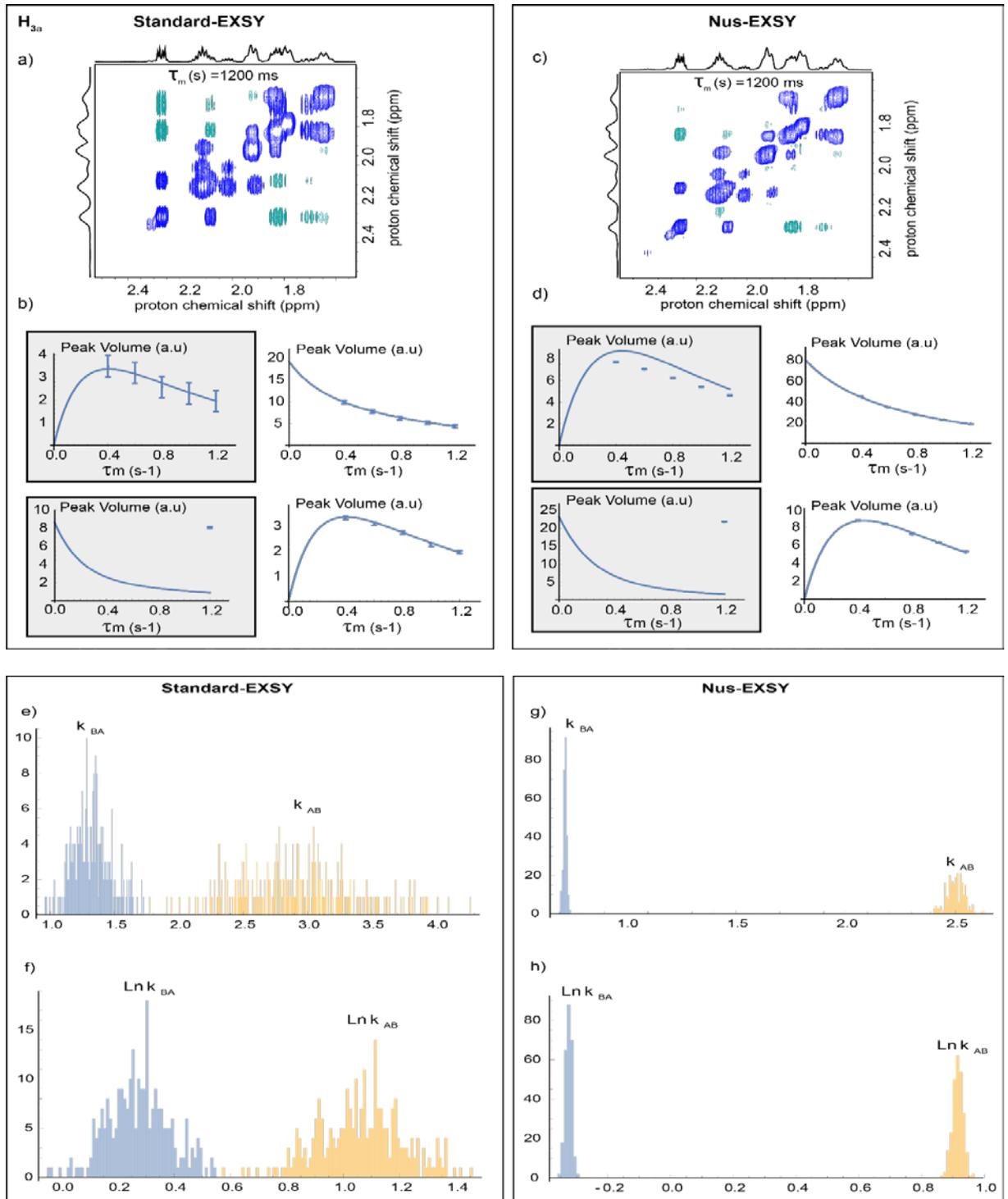
VIII.B.1 H<sub>2</sub>

## VIII.B.2 H3

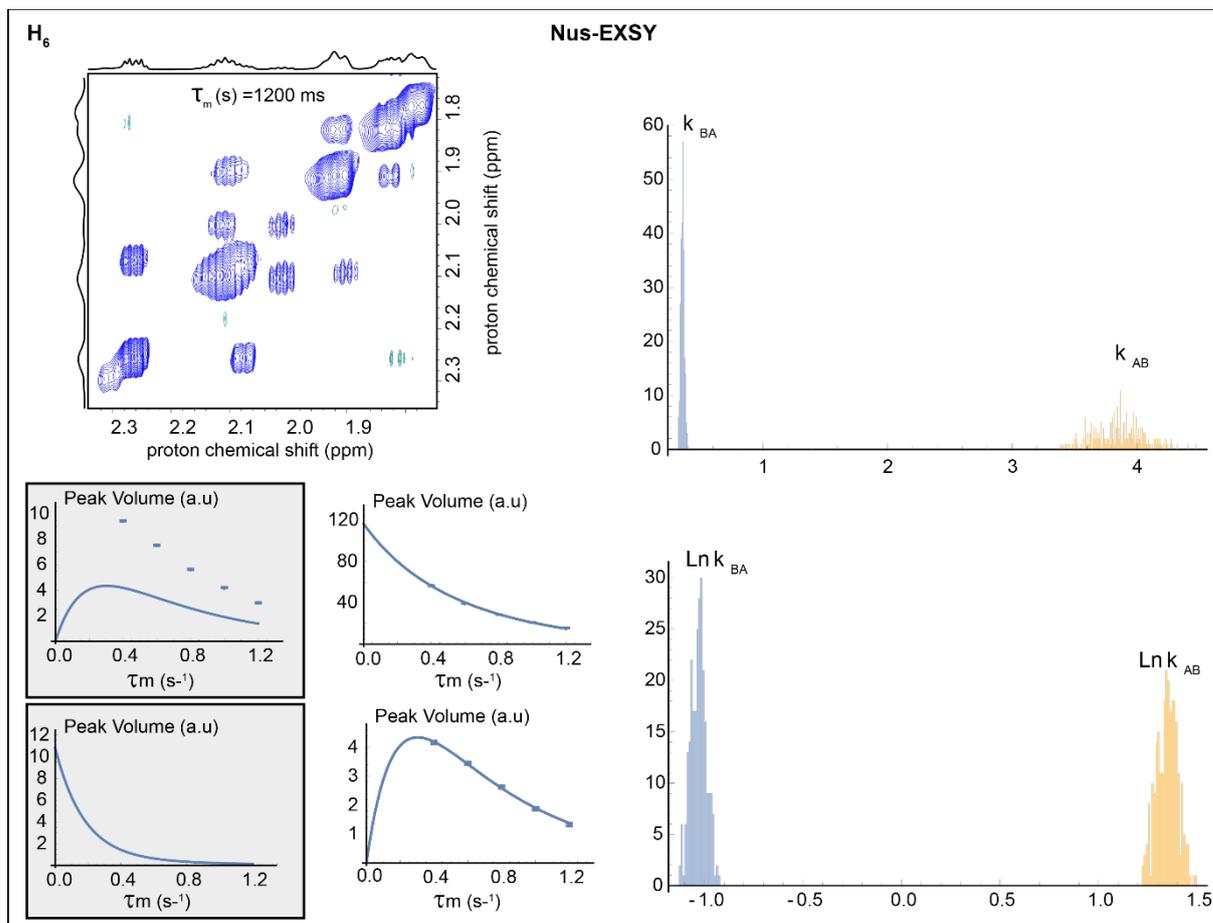


VIII.B.3  $H^3$ 

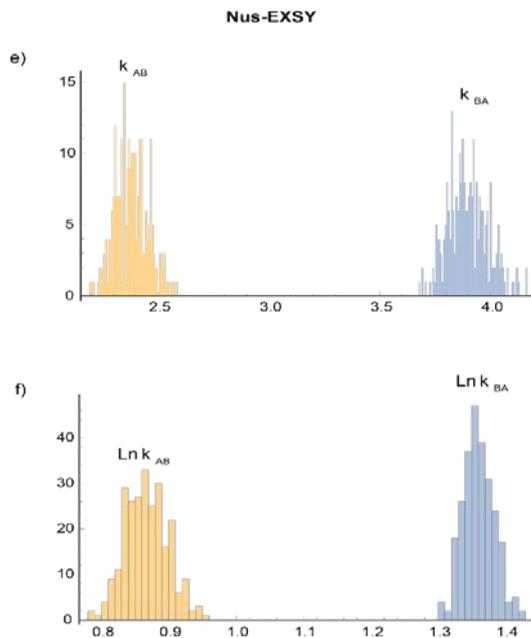
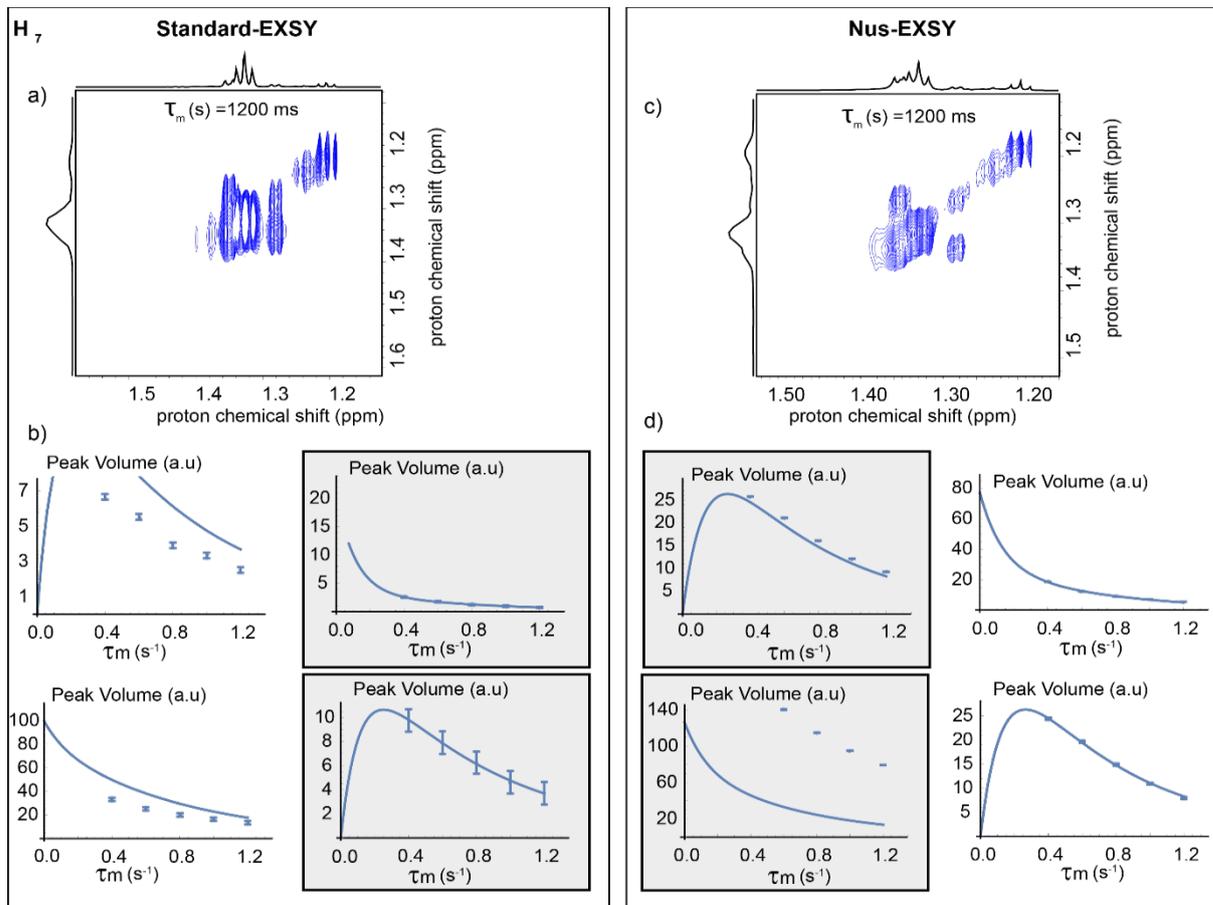
## VIII.B.4 H3a



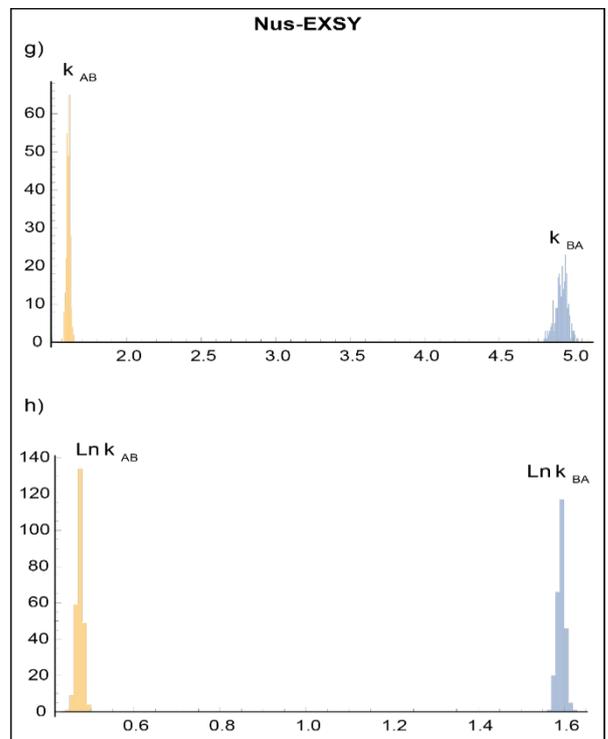
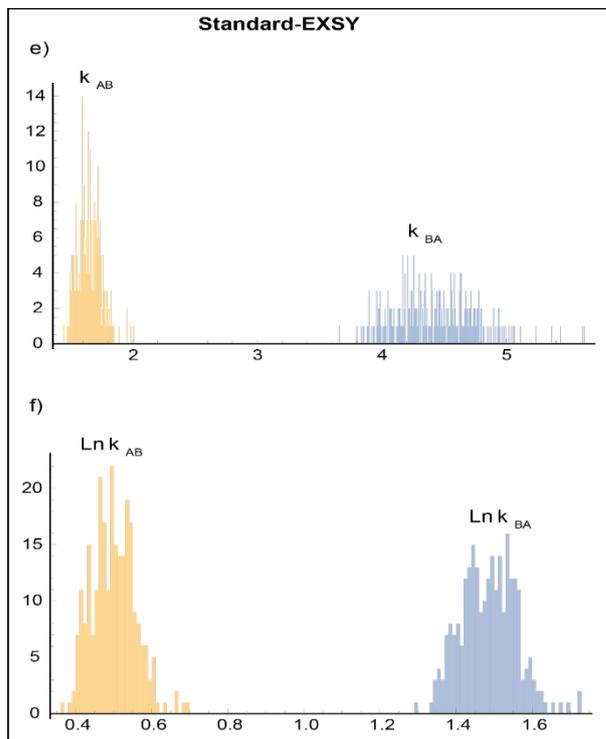
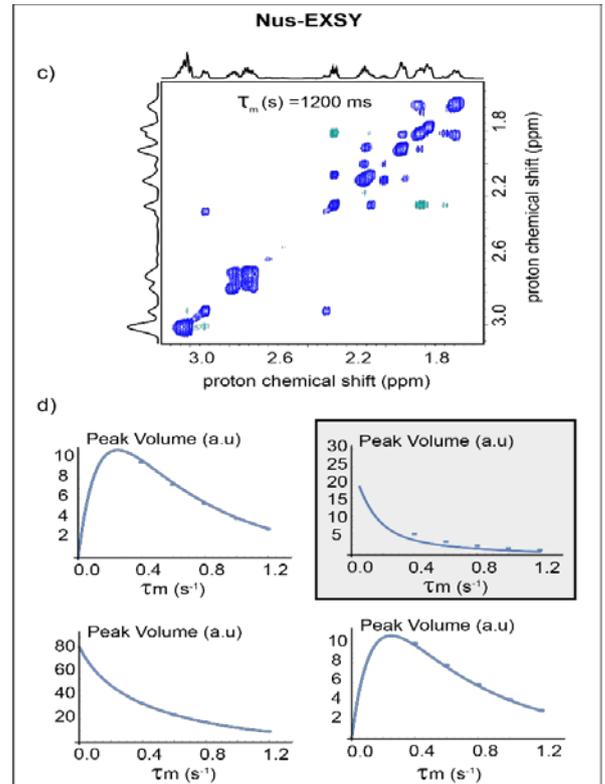
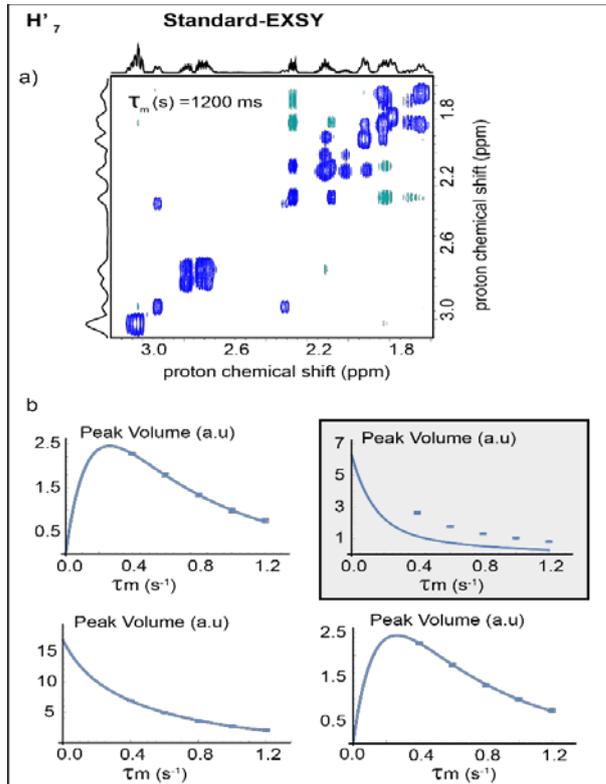
## VIII.B.5 H6



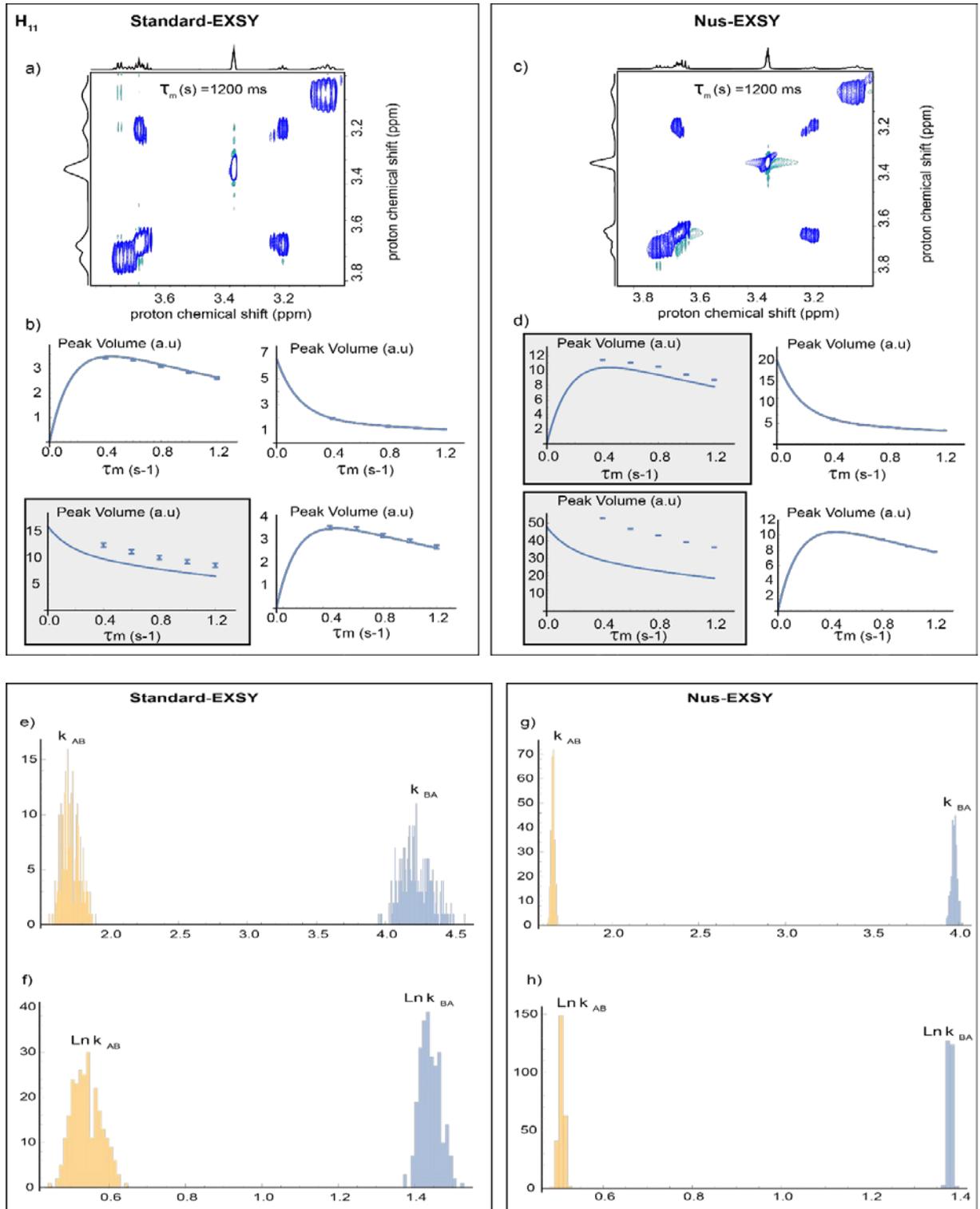
## VIII.B.6 H7



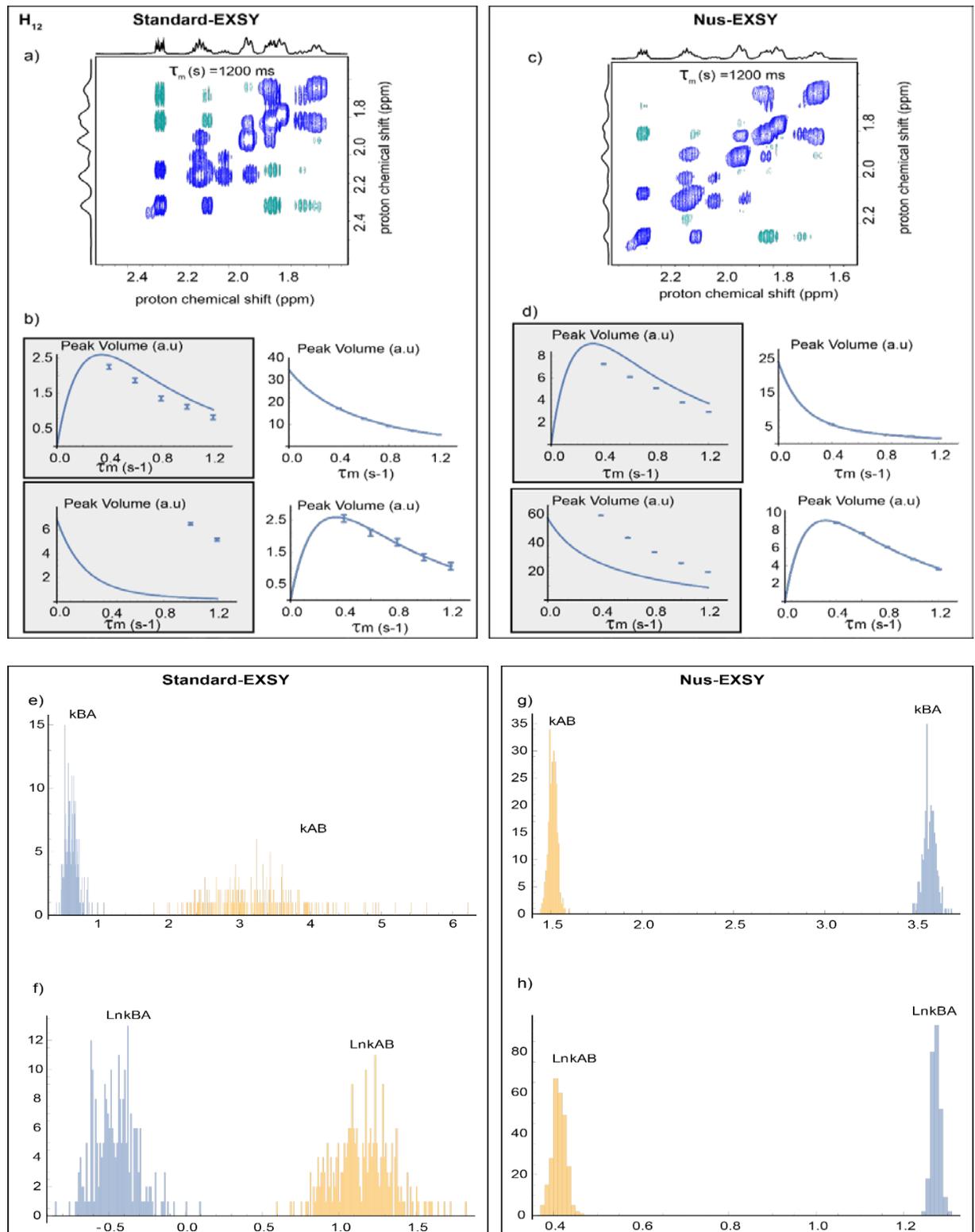


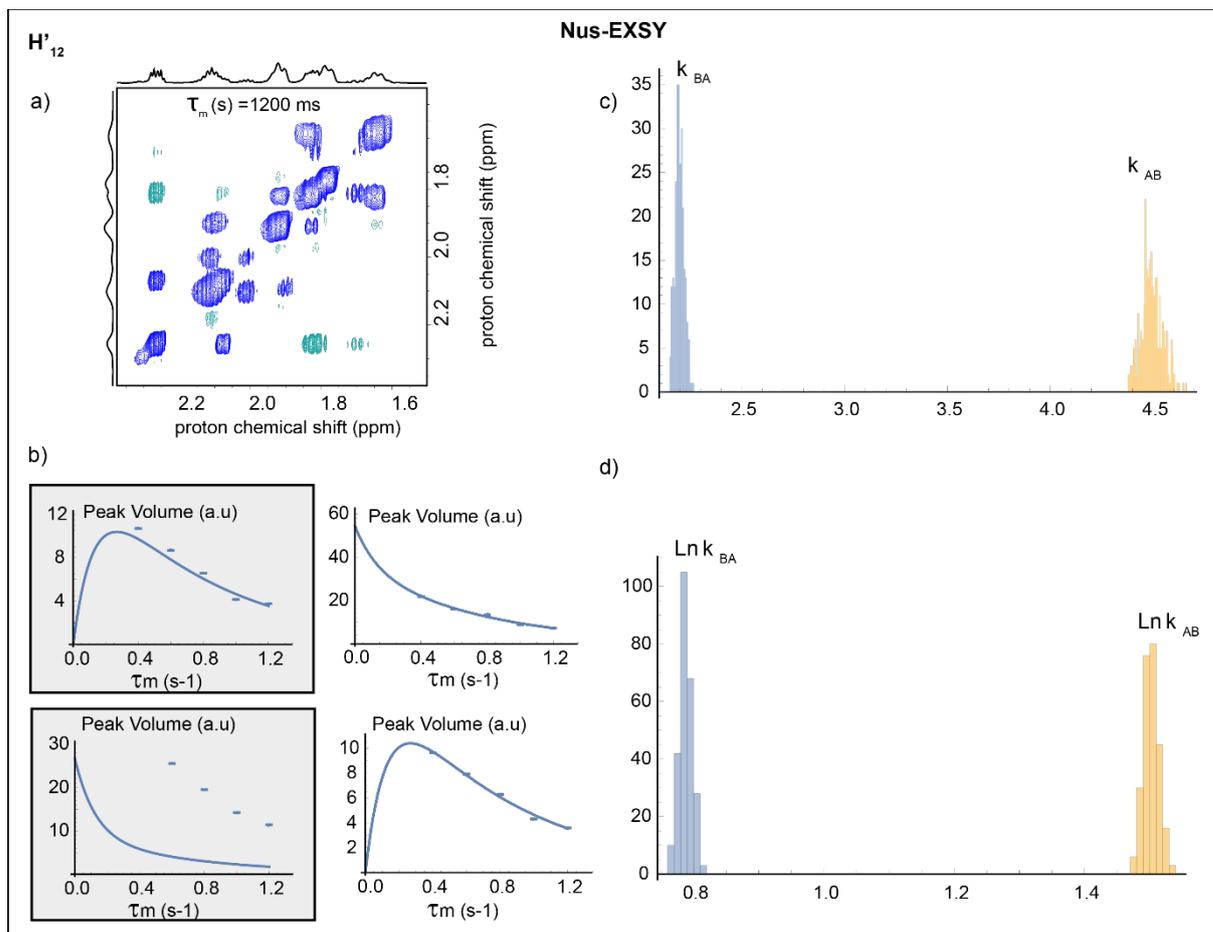
VIII.B.7  $H^7$ 

## VIII.B.8 H11

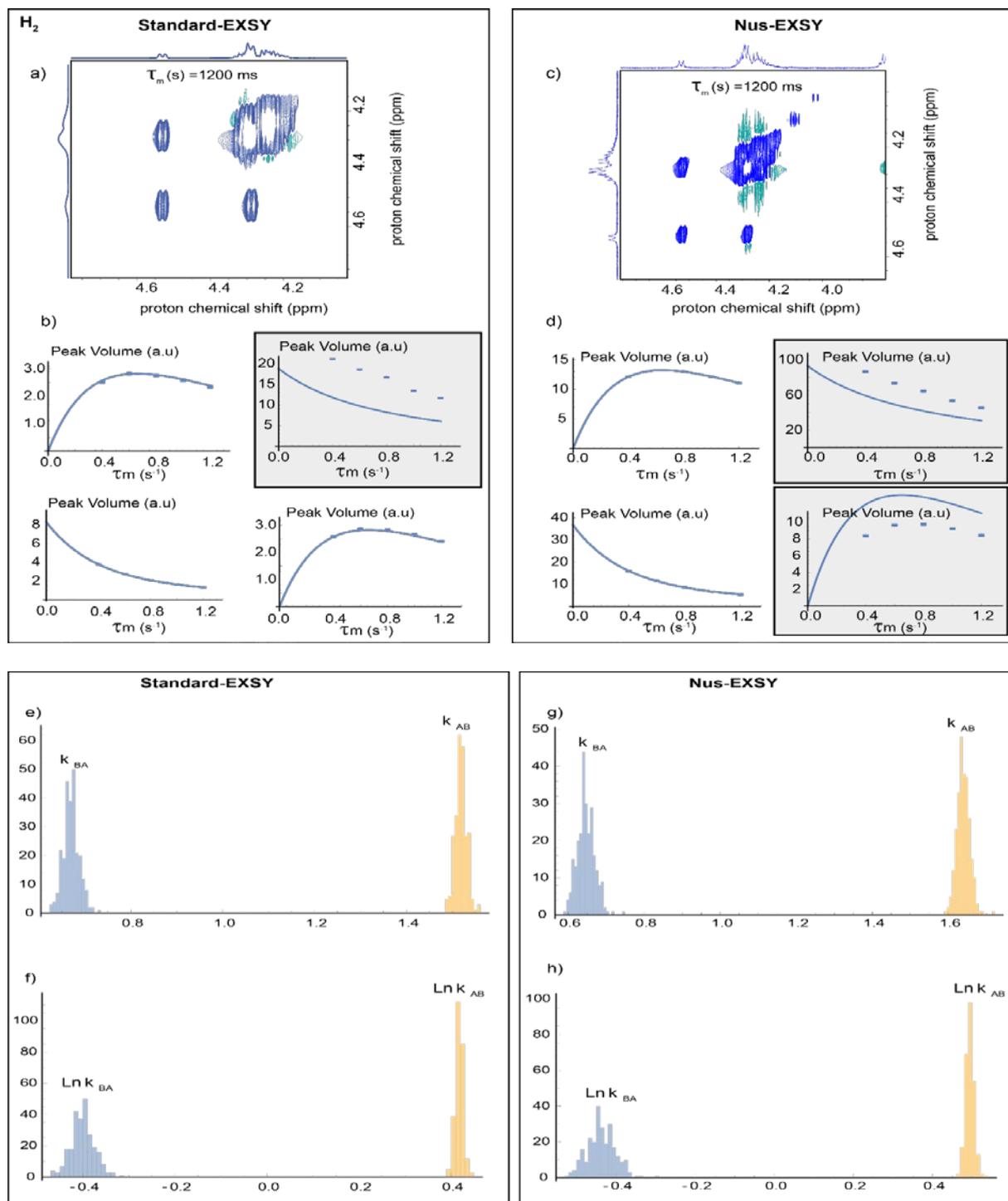


## VIII.B.9 H12

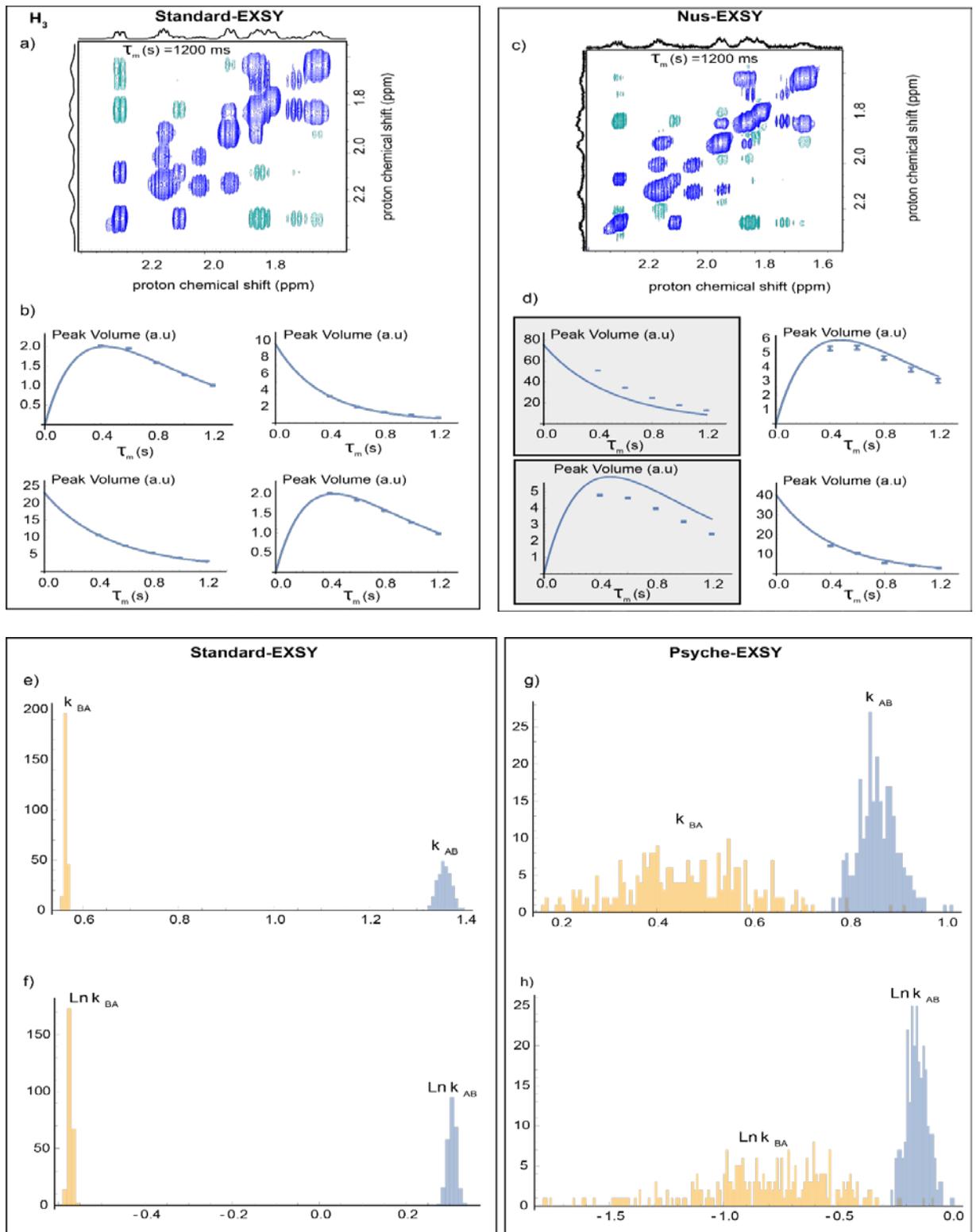


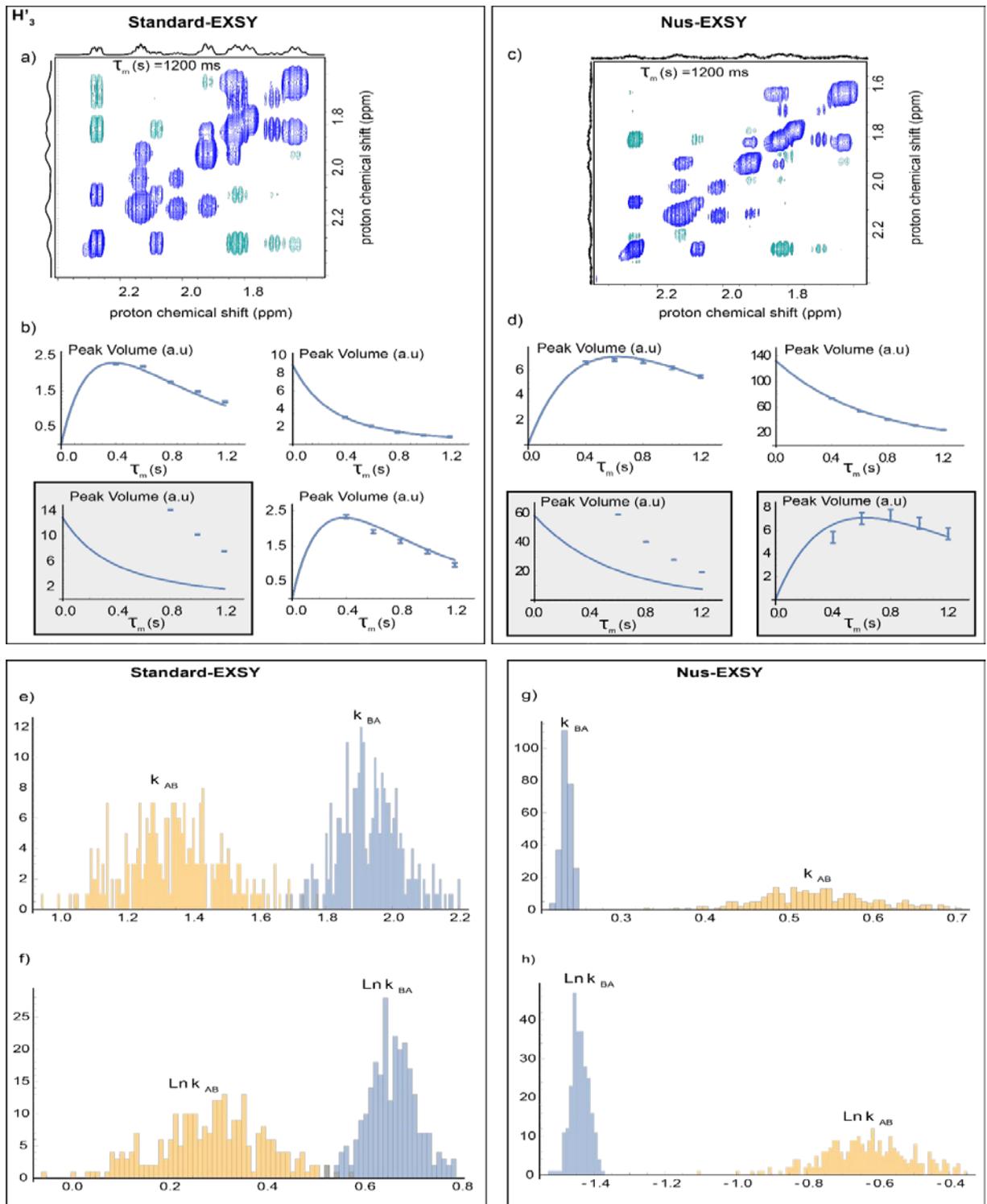
VIII.B.10 H<sup>12</sup>

## VIII.C Spectre EXSY enregistrés à 300 K

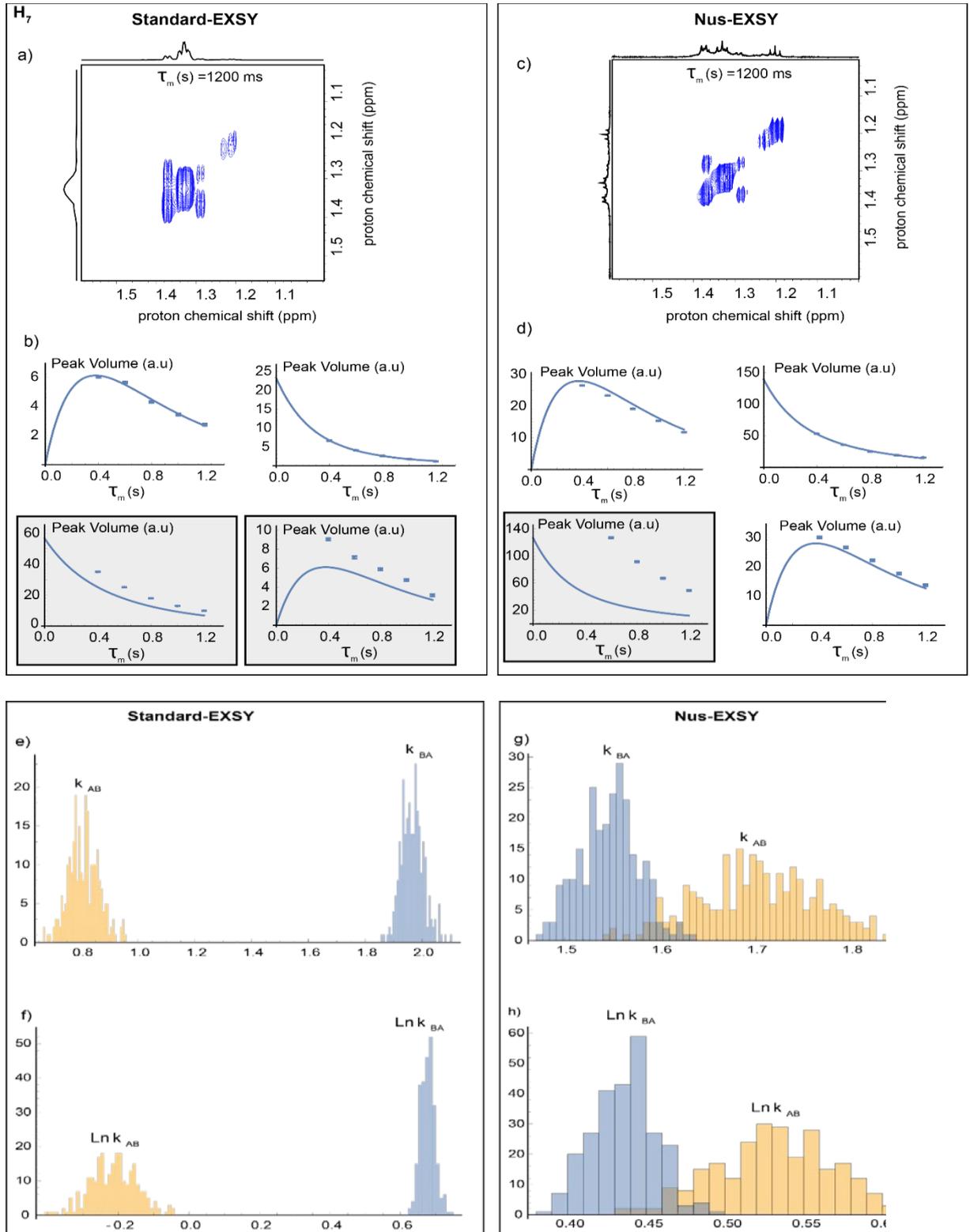
VIII.C.1 H<sub>2</sub>

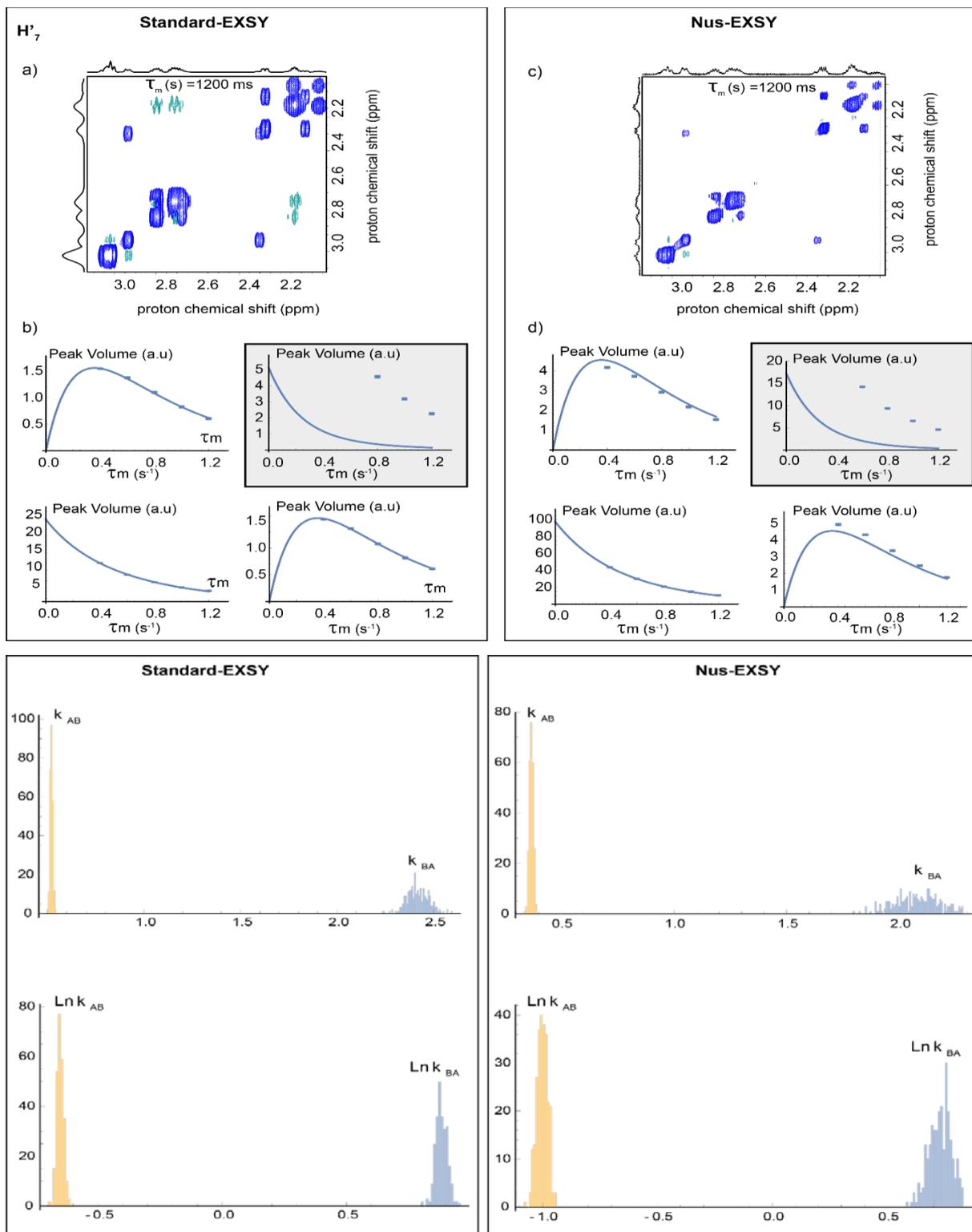
## VIII.C.2 H3



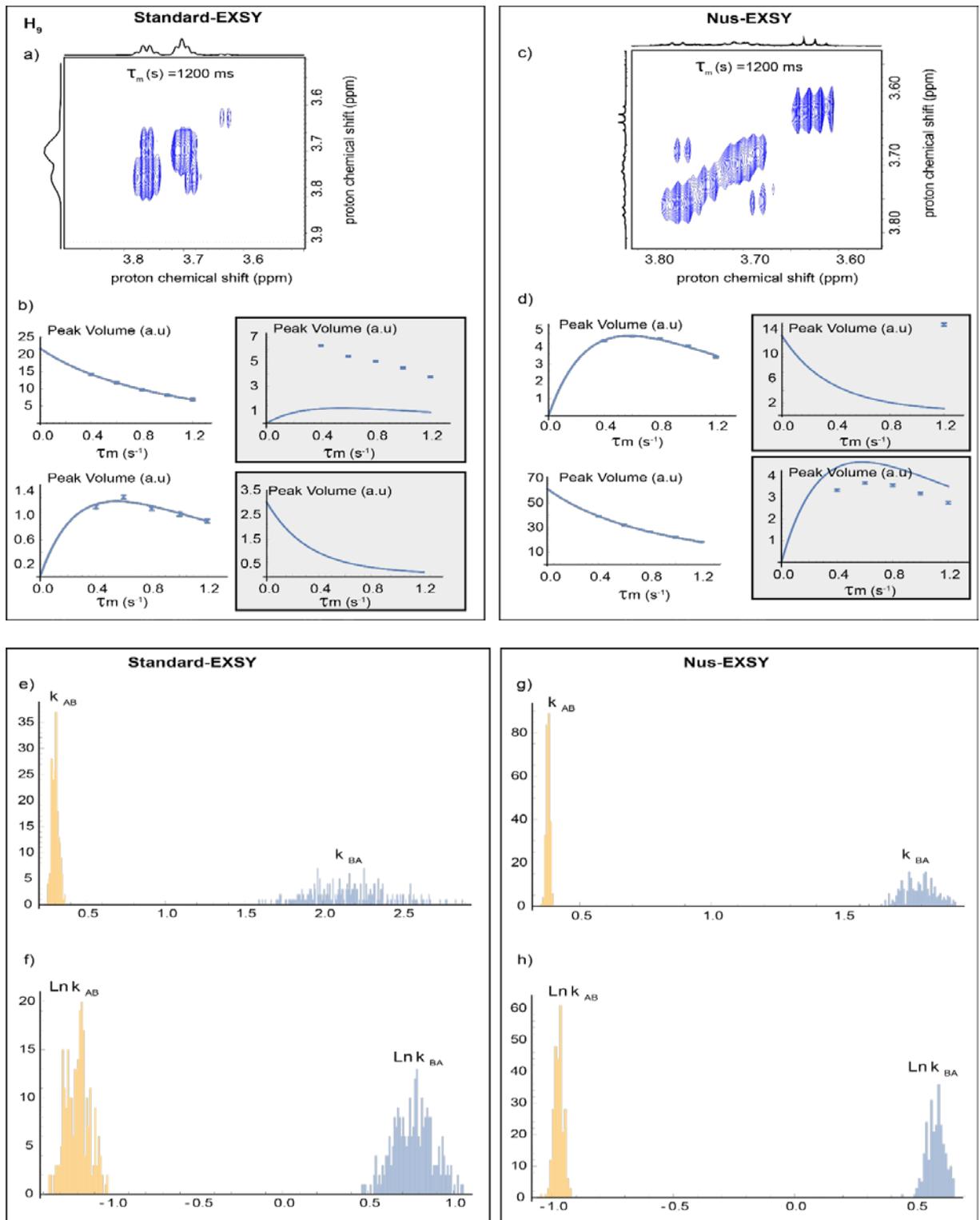
VIII.C.3  $H'_3$ 

## VIII.C.4 H7

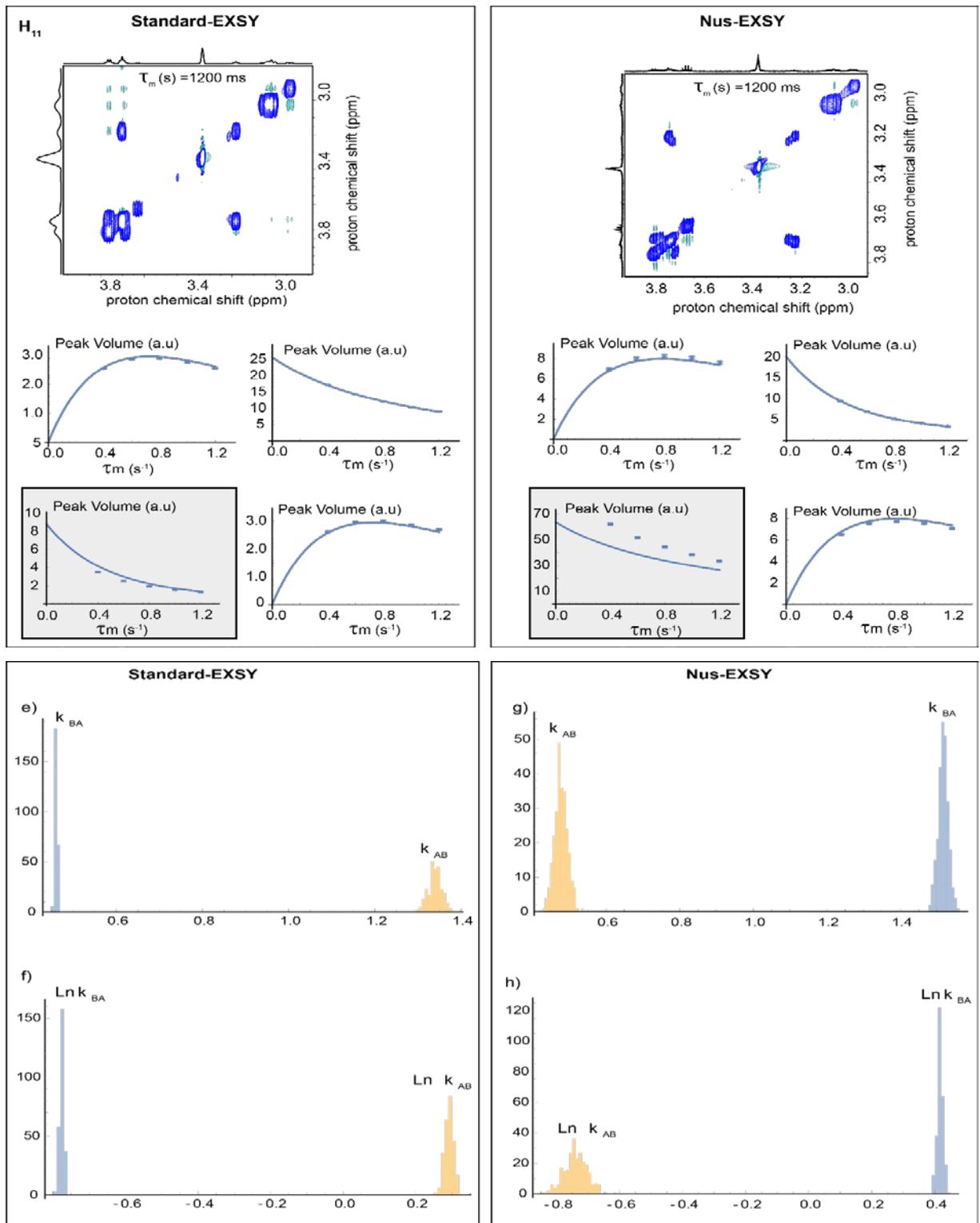


VIII.C.5  $H'_7$ 

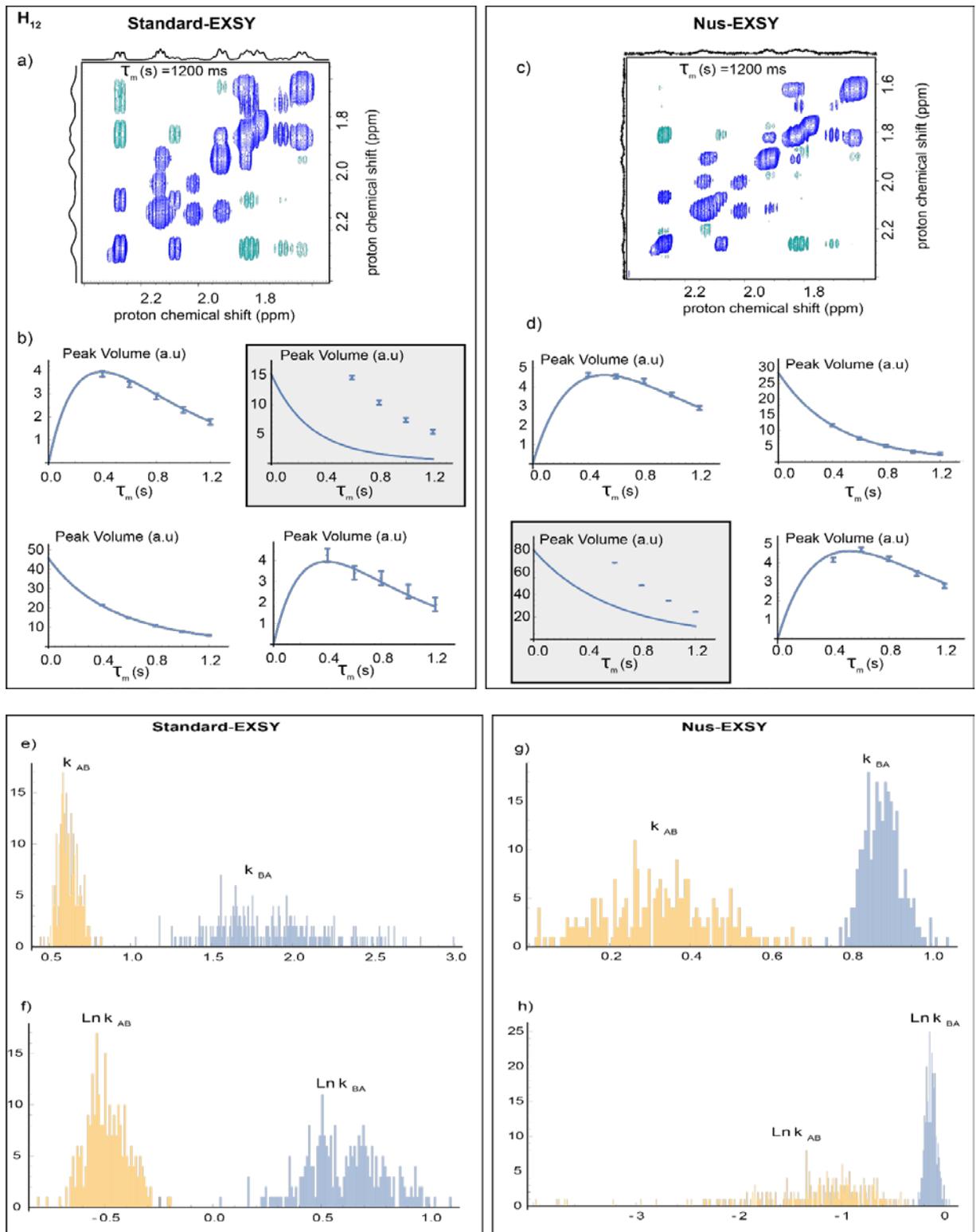
## VIII.C.6 H9



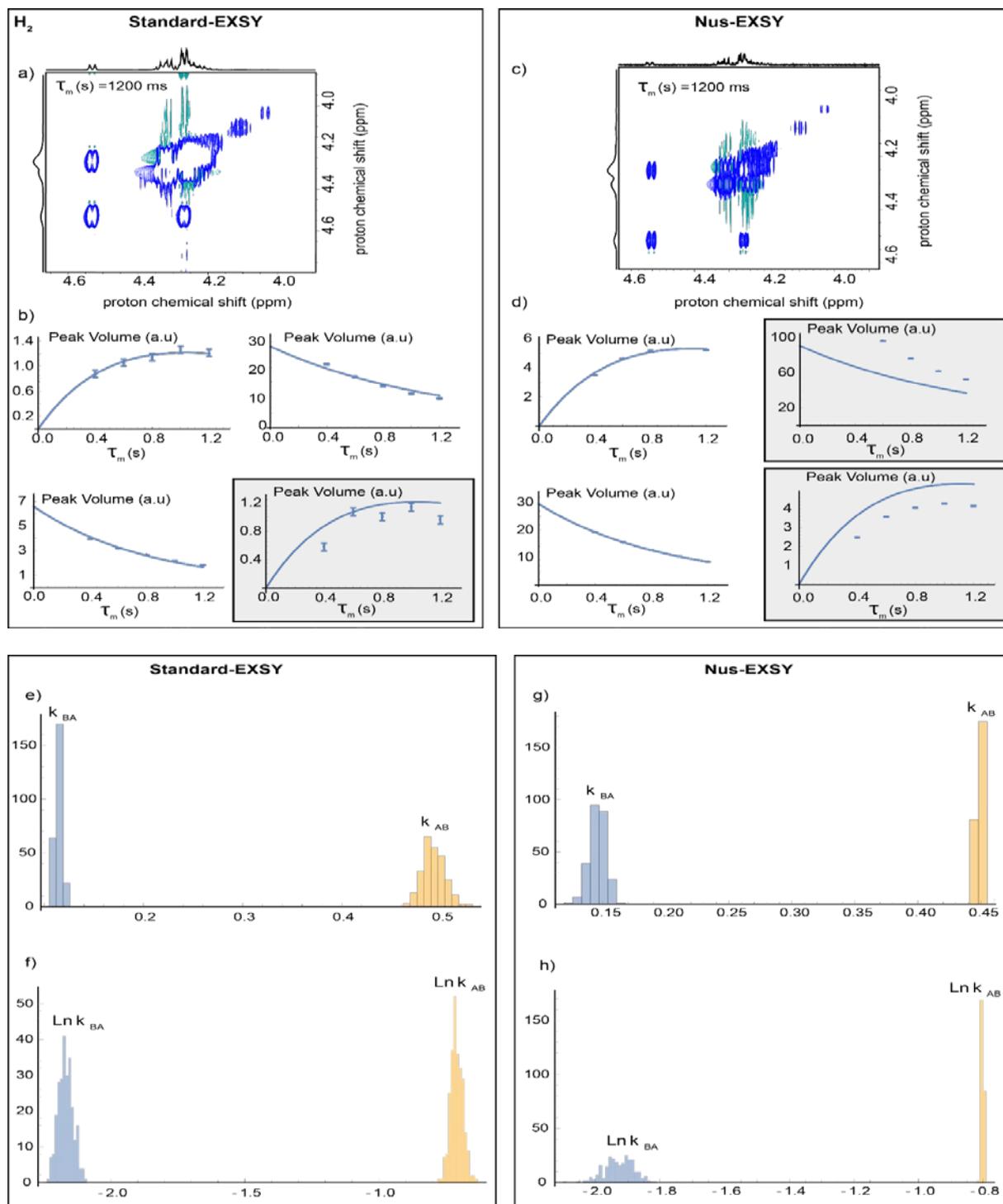
## VIII.C.7 H11

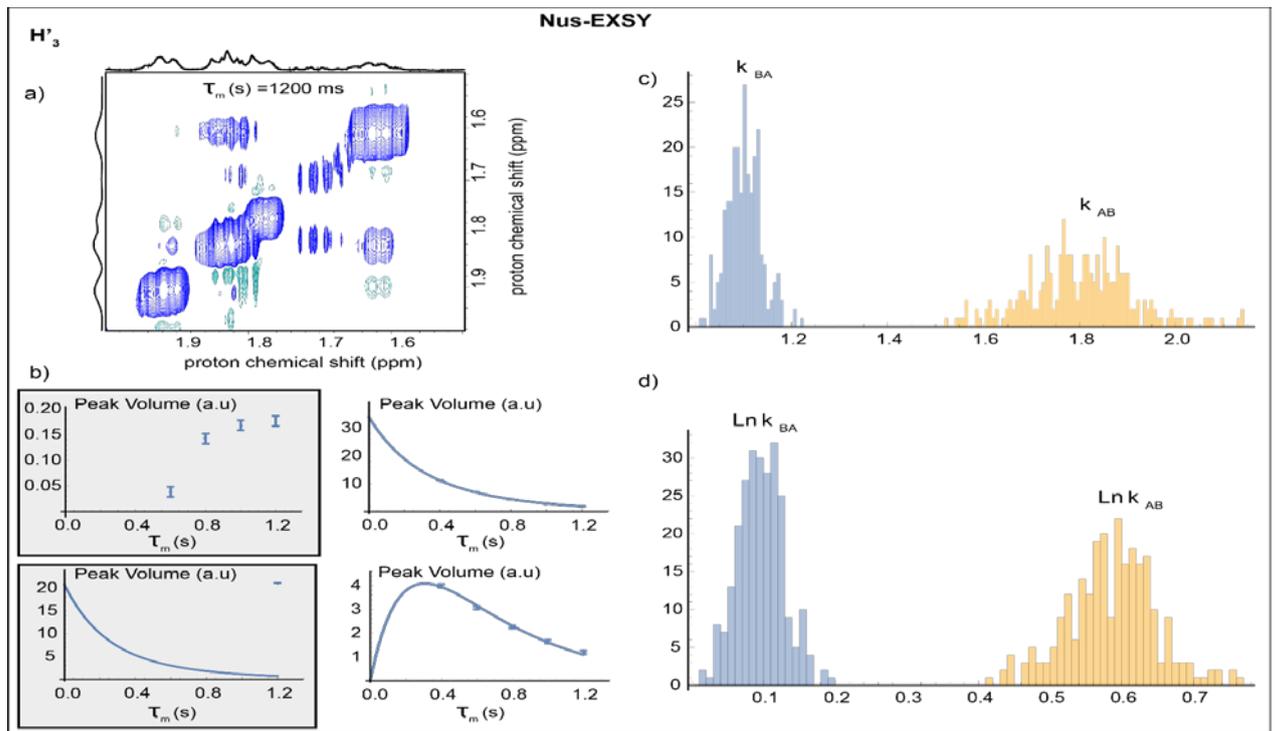


## VIII.C.8 H12

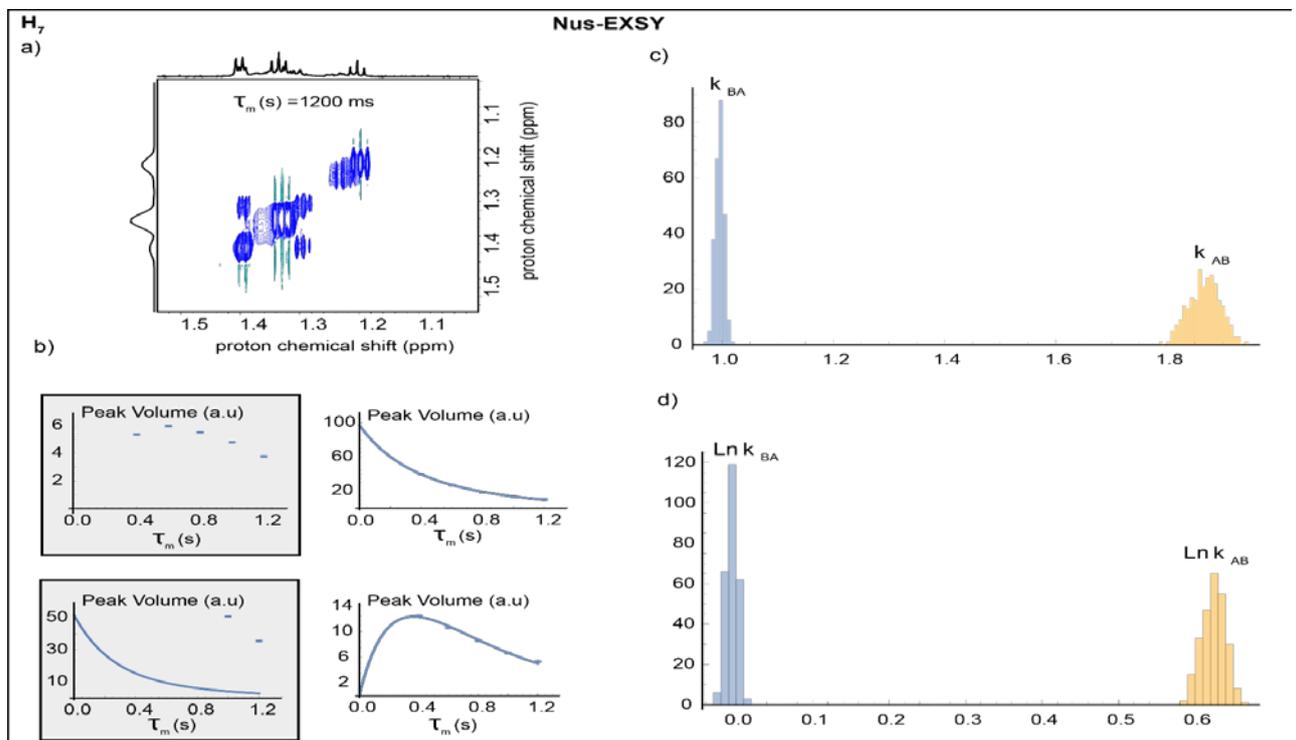


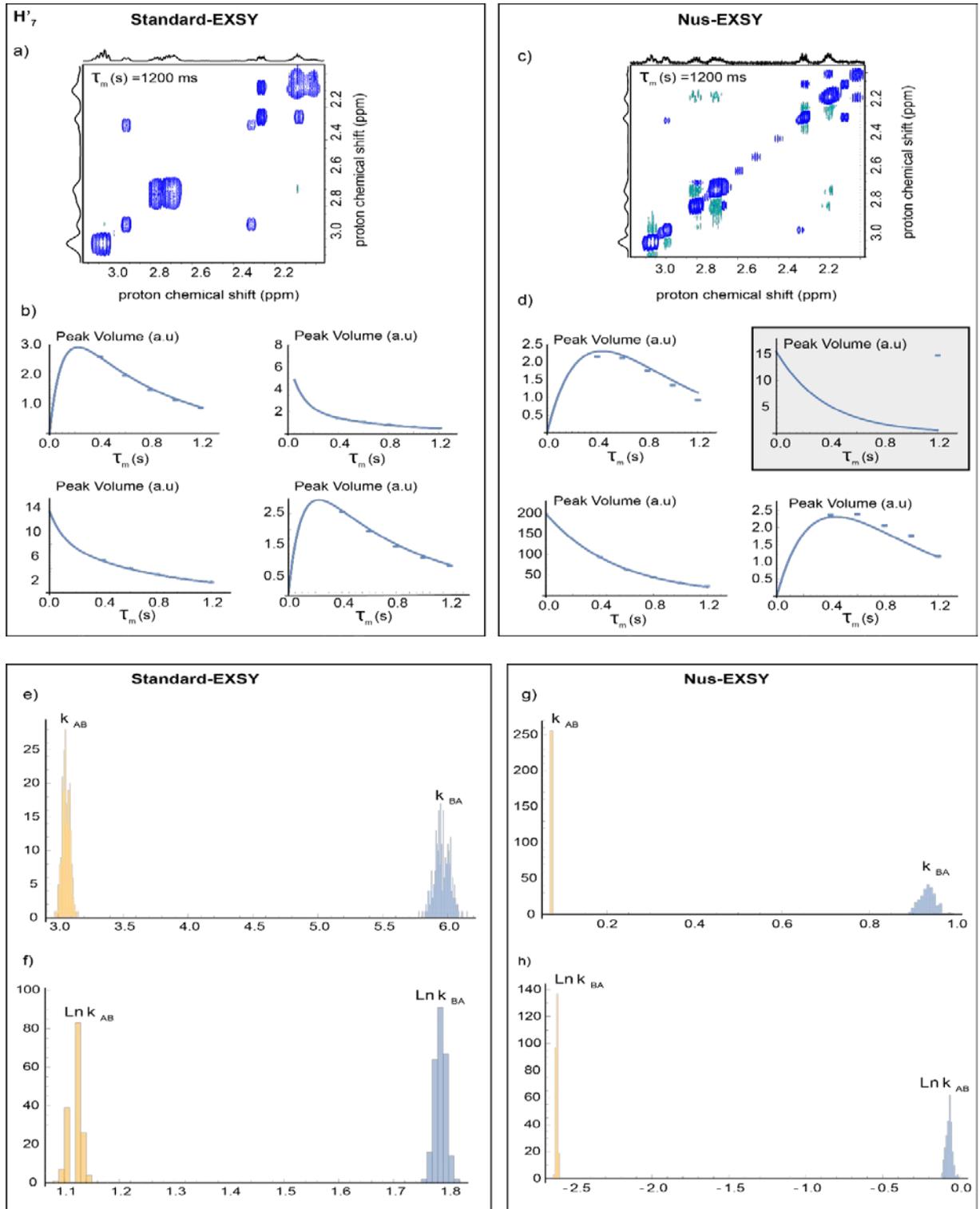
## VIII.D Spectre EXSY enregistrés à 290 K

VIII.D.1 H<sub>2</sub>

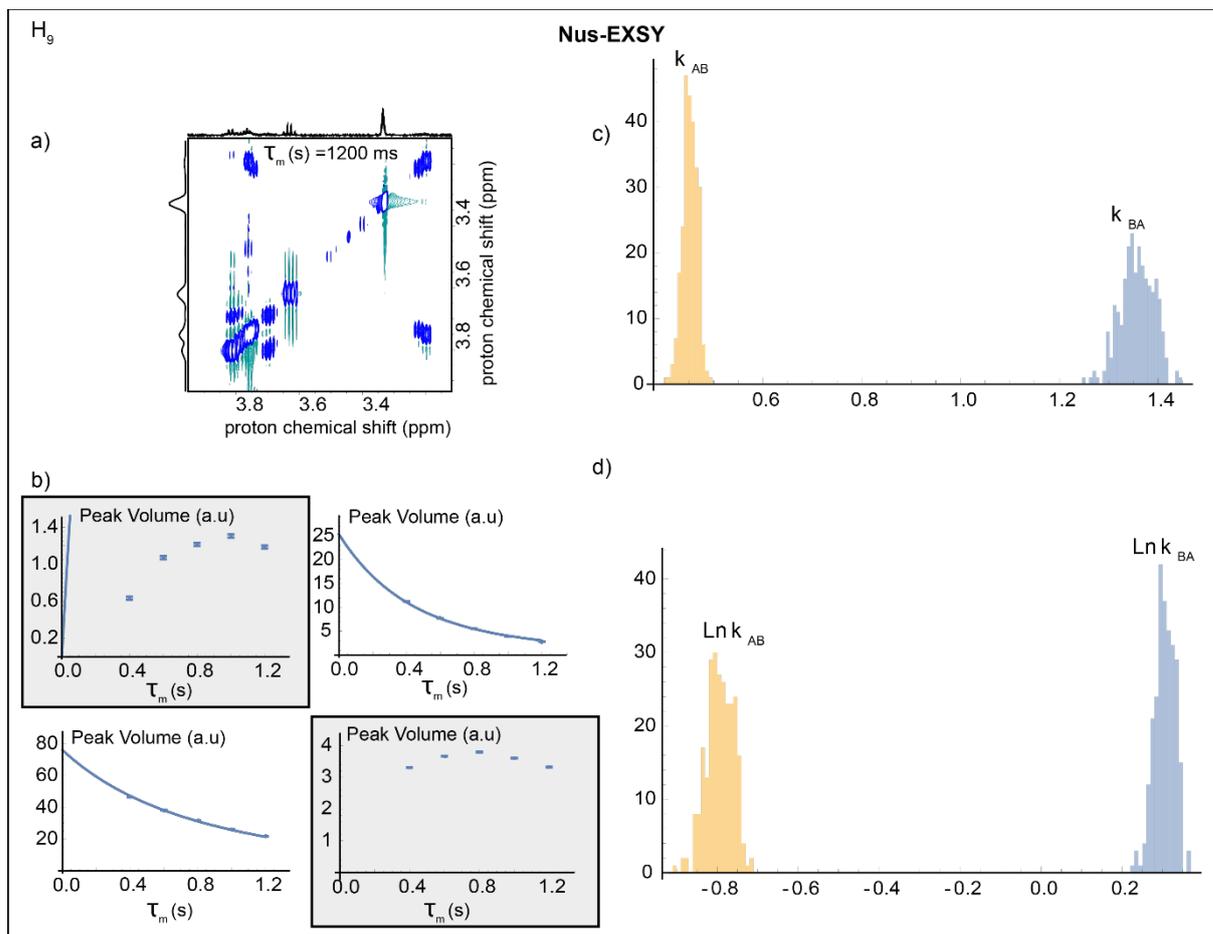
VIII.D.2  $H^3$ 

H7

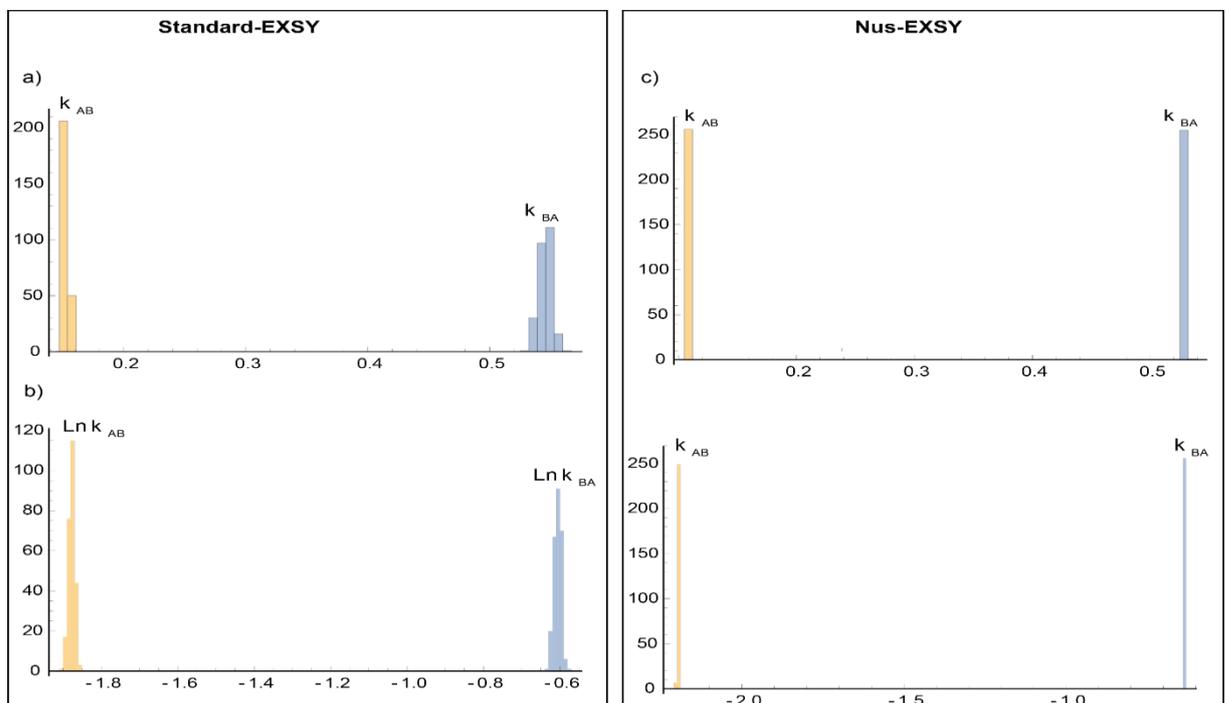
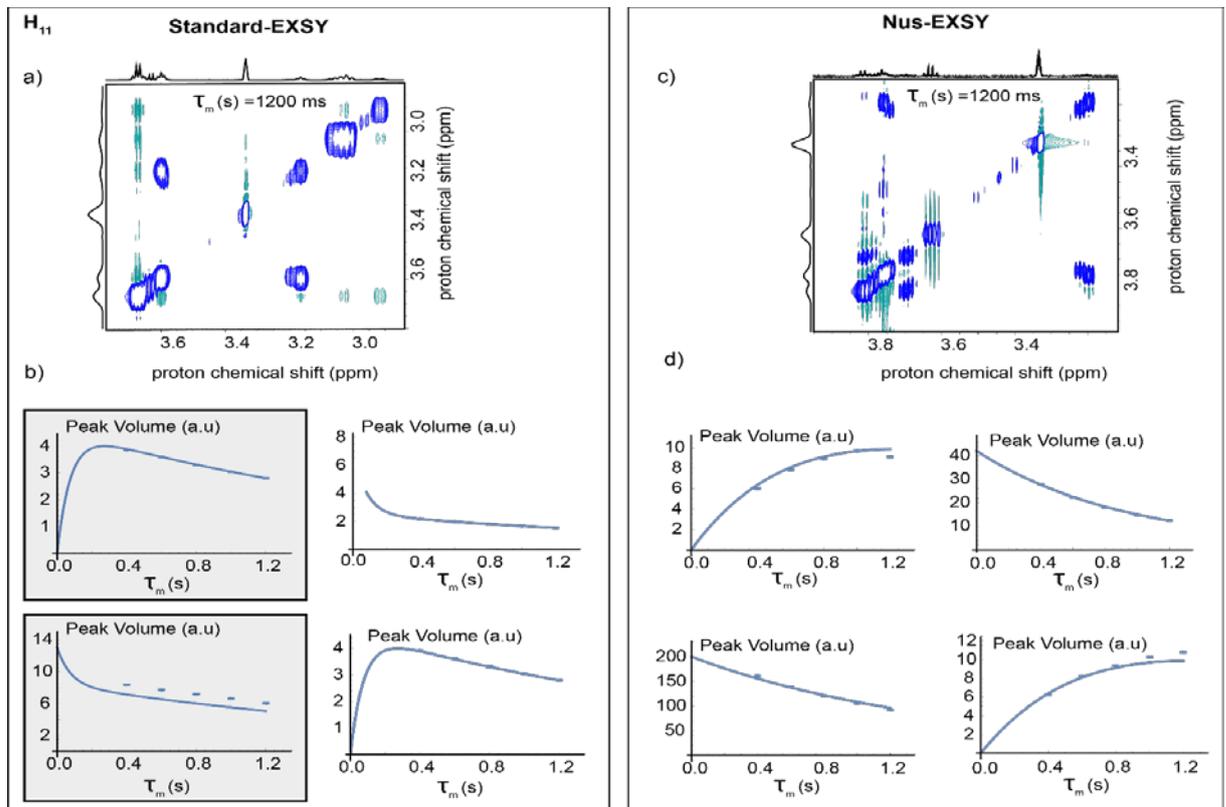


VIII.D.3  $H'_7$ 

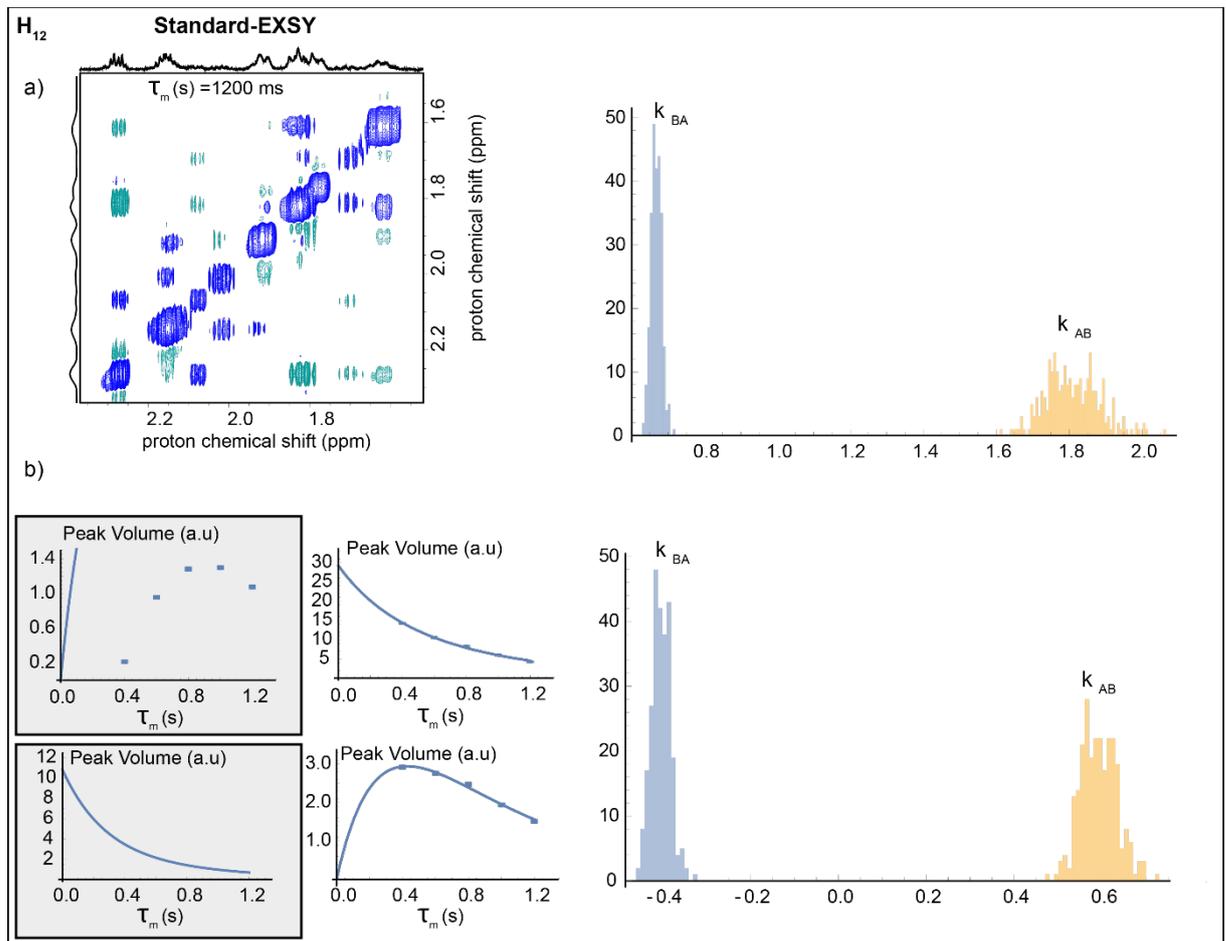
## VIII.D.4 H9



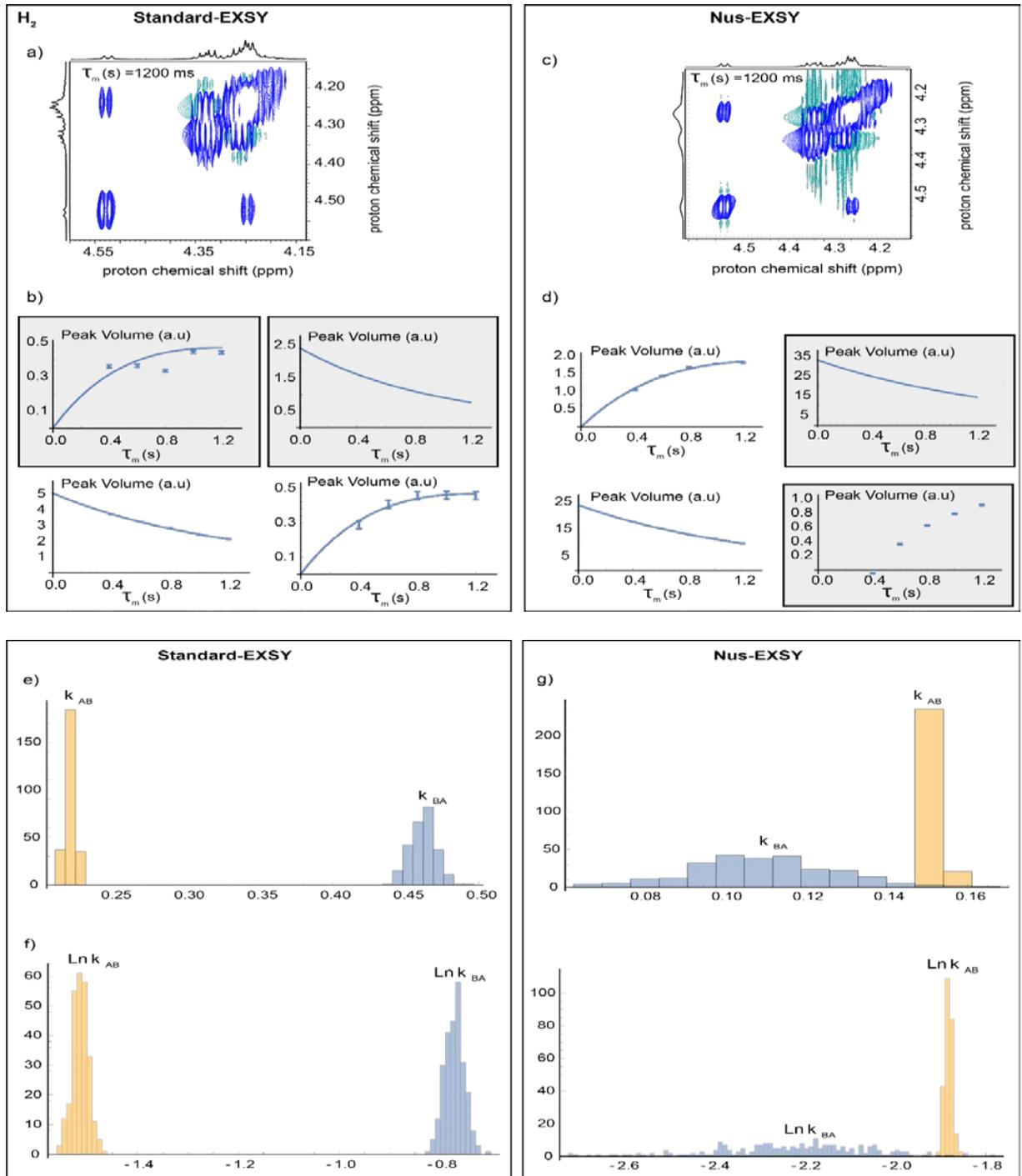
## VIII.D.5 H11



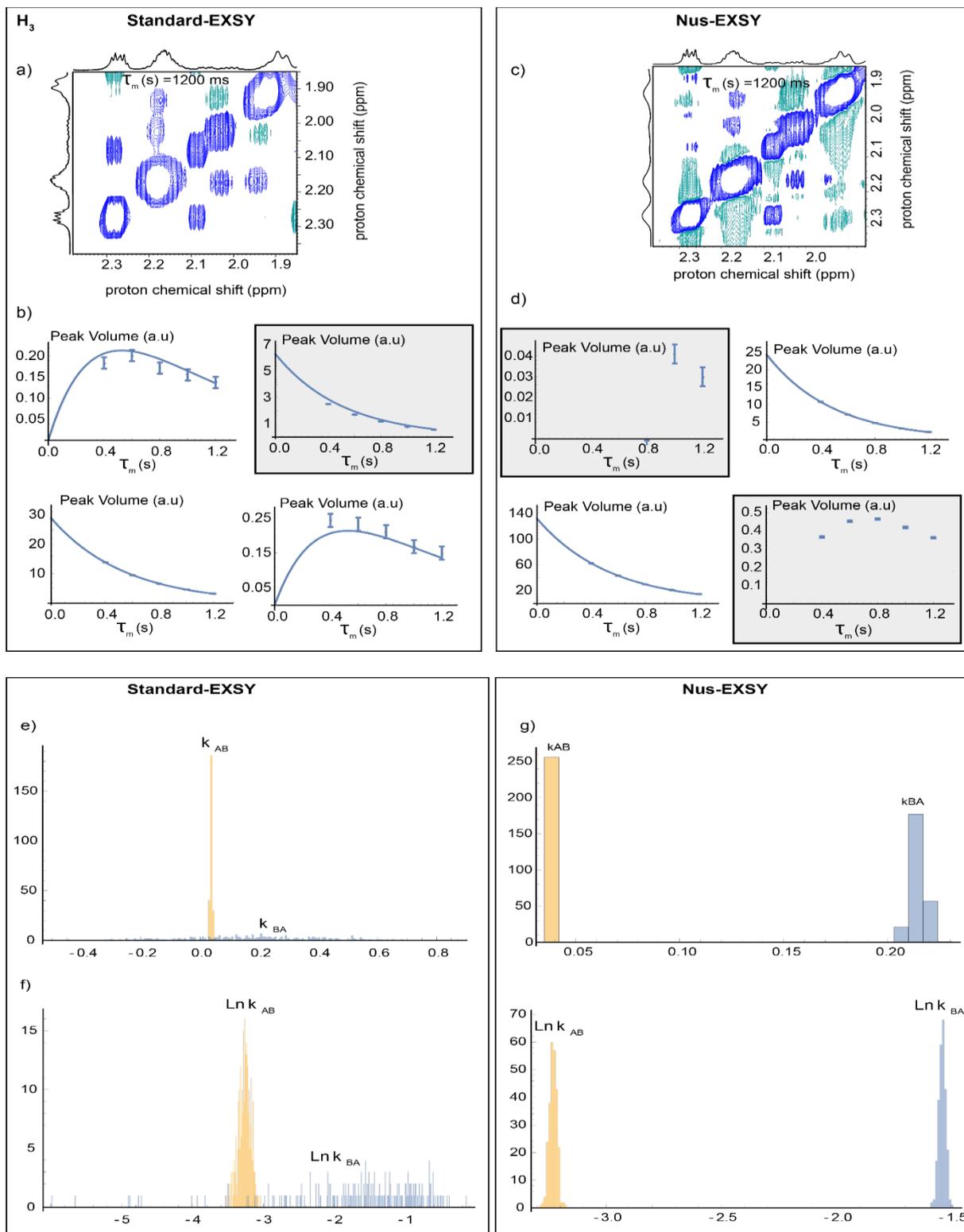
## VIII.D.6 H12



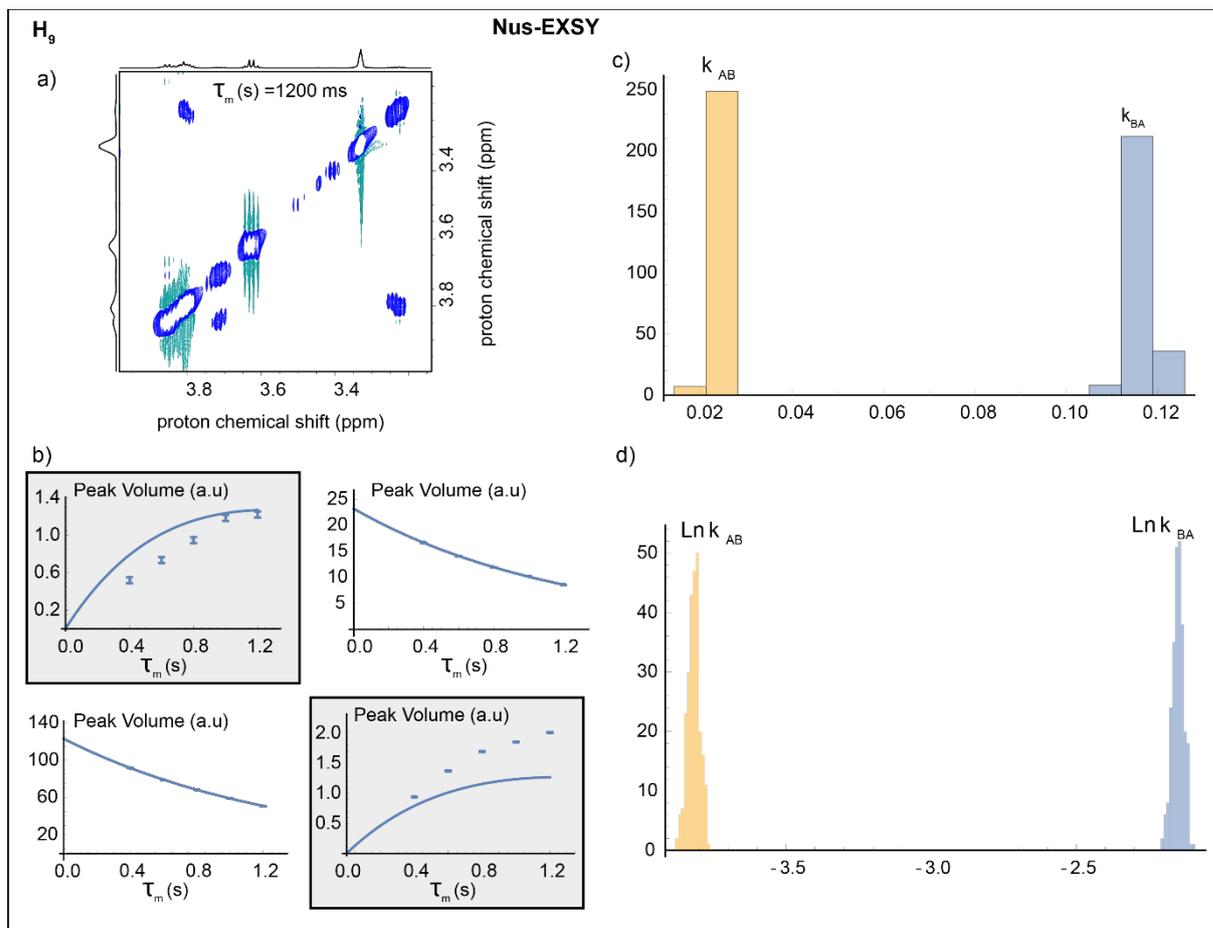
## VIII.E Spectre EXSY enregistrés à 280 K

VIII.E.1 H<sub>2</sub>

## VIII.E.2 H3



## VIII.E.3 H9



## IX. Analyse des paramètres d'échange et de relaxation.

### IX.A EXSY NUS

T=320 K	$k_{AB}$ (s <sup>-1</sup> )	$k_{BA}$ (s <sup>-1</sup> )	$T_1$ (s)	$K_{AB}=k_A$ B/ $k_{BA}$
H2	8,2 ± 0,2	3,73 ± 0,09	1,63 ± 0,01	2,20
H3				
H'3	4,002 ± 0,056	1,36 ± 0,01	0,801 ± 0,002	2,94
H3a				
H6	11,1 ± 0,4	1,9 ± 0,2	0,742 ± 0,006	5,84
H7	6,6 ± 0,6	4,7±0,4	0,81 ± 0,03	1,40
H'7	5,40 ± 0.04	2,63 ± 0,02	0,689 ± 0,001	2,05
H7a				
H9				
H11	8,3 ± 0,3	4,02 ± 0,15	2,25 ± 0,01	2,06
H12				
H'12	7,8 ± 0.4	0,96 ± 0,05	0,776 ± 0,003	8,13

<b>T=310 K</b>	<b><math>k_{AB}</math> (s<sup>-1</sup>)</b>	<b><math>k_{BA}</math> (s<sup>-1</sup>)</b>	<b><math>T_1</math> (s)</b>	<b><math>K_{AB}=k_A</math> <math>B/k_{BA}</math></b>
<b>H2</b>	4,217 ± 0,007	1,513 ± 0,003	1,547 ± 0,002	2,79
<b>H3</b>	4,42 ± 0,02	1,470 ± 0,007	0,7267 ± 0,0009	3,01
<b>H'3</b>	2,62 ± 0,03	1,60 ± 0,03	0,658 ± 0,004	1,64
<b>H3a</b>	2,50 ± 0,04	0,722 ± 0,007	0,9 ± 0,1	3,46
<b>H6</b>	3,8 ± 0,2	0,35 ± 0,01	0,613 ± 0,003	10,86
<b>H7</b>	3,89 ± 0,09	2,37 ± 0,07	0,6831 ± 0,006	1,64
<b>H'7</b>	3,29 ± 0,01	1,217 ± 0,004	0,6254 ± 0,0007	2,70
<b>H7a</b>				
<b>H9</b>				
<b>H11</b>	3,97 ± 0,01	1,659 ± 0,009	2,02 ± 0,01	2,39
<b>H12</b>	3,562 ± 0,03	1,50 ± 0,02	0,792 ± 0,005	2,37
<b>H'12</b>	4,49 ± 0,05	2,19 ± 0,02	0,743 ± 0,001	2,05

T=300 K	$k_{AB}$ (s <sup>-1</sup> )	$k_{BA}$ (s <sup>-1</sup> )	$T_1$ (s)	$K_{AB}=k_{AB}/k_{BA}$
H2	1,64 ± 0,01	0,64 ± 0,02	1,49 ± 0,02	2,56
H3	0,83 ± 0,03	0,5 ± 0,1	0,622 ± 0,009	1,66
H'3	0,53 ± 0,06	0,236 ± 0,005	0,55 ± 0,05	2,25
H3a				
H6				
H7	1,70 ± 0,06	1,54 ± 0,03	0,64 ± 0,01	1,10
H'7	2,43 ± 0,09	0,364 ± 0,008	0,568 ± 0,007	6,68
H7a				
H9	1,79 ± 0,06	0,378 ± 0,007	1,15 ± 0,01	4,74
H11	1,51 ± 0,01	0,47 ± 0,01	1,90 ± 0,03	3,21
H12	0,87 ± 0,04	0,3 ± 0,1	0,623 ± 0,003	2,90
H'12				

T=290 K	$k_{AB} (s^{-1})$	$k_{BA} (s^{-1})$	$T_1 (s)$	$K_{AB}=k_{AB}/k_{BA}$
H2	$0,448 \pm 0,001$	$0,146 \pm 0,006$	$1,573 \pm 0,006$	3,07
H3				
H'3	$1,8 \pm 0,1$	$1,10 \pm 0,03$	$0,495 \pm 0,004$	1,64
H3a				
H6				
H7	$1,86 \pm 0,02$	$0,994 \pm 0,007$	$0,643 \pm 0,002$	1,87
H'7	$0,93 \pm 0,01$	$0,0728 \pm 0,0004$	$0,5498 \pm 0,0006$	12,77
H7a				
H9	$1,36 \pm 0,03$	$0,45 \pm 0,01$	$1,180 \pm 0,009$	3,02
H11	$0,5303 \pm 0,0005$	$0,1111 \pm 0,0001$	$1,883 \pm 0,007$	4,77
H12	$1,79 \pm 0,07$	$0,66 \pm 0,01$	$0,765 \pm 0,005$	2,71
H'12				

T=280 K	$k_{AB} (s^{-1})$	$k_{BA} (s^{-1})$	$T_1 (s)$	$K_{AB} = k_{AB}/k_B$ A
H2	$0,156 \pm 0,001$	$0,13 \pm 0,01$	$1,682 \pm 0,004$	1,20
H3	$0,214 \pm 0,003$	$0,0396 \pm 0,0006$	$0,5493 \pm 0,0004$	5,40
H'3				
H3a				
H6				
H7				
H'7				
H7a				
H9				
H11	$0,116 \pm 0,002$	$0,0220 \pm 0,0004$	$1,401 \pm 0,002$	5,27
H12				
H'12				

### I.A Distributions des vitesses d'échange

Evolution des  $k_{AB}$  et  $k_{BA}$  pour les différents sites de protons dans le Trandolapril étudié par l'analyse d'EXSY standard (bleu) et EXSY Nus (rouge). Les barres d'erreur correspondent à 2 fois l'écart type indiqué ci-dessus. Les astérisques correspondent aux protons pour lesquels  $\sigma$  était très grand.

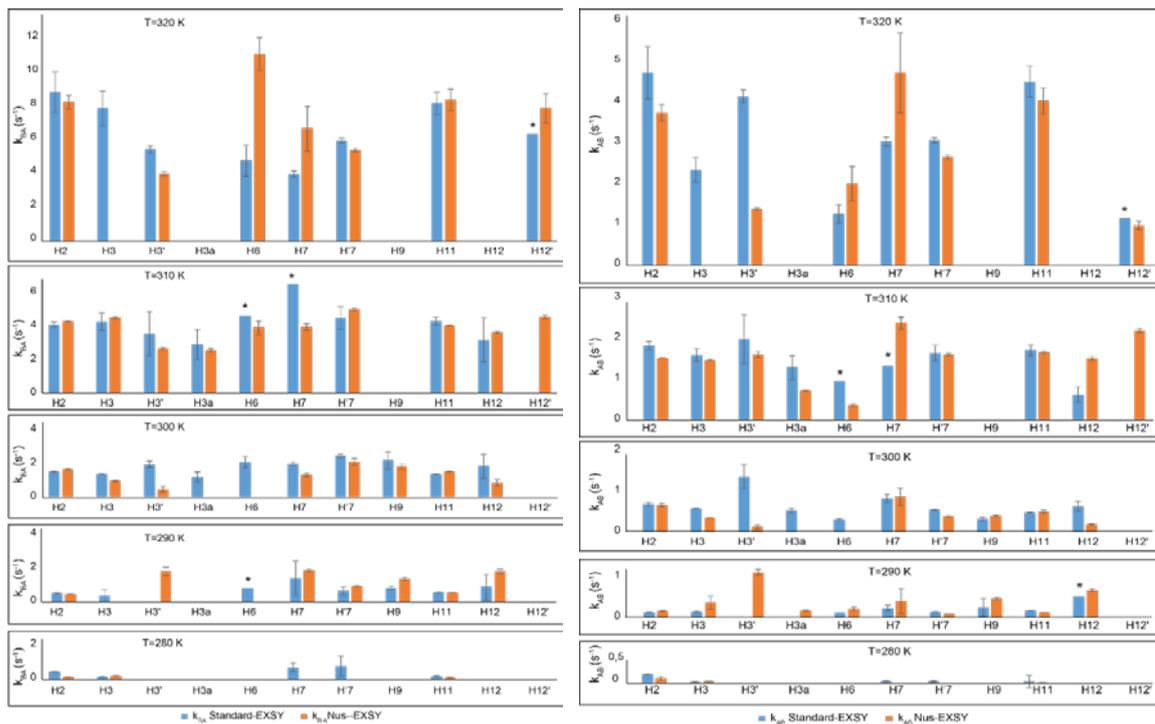


Figure S4. Diagrammes des  $k_{AB}$  et  $k_{BA}$  extraits pour les différents sites de protons à 5 températures différentes de 280 à 320 K (EXSY standard-EXSY NUS).

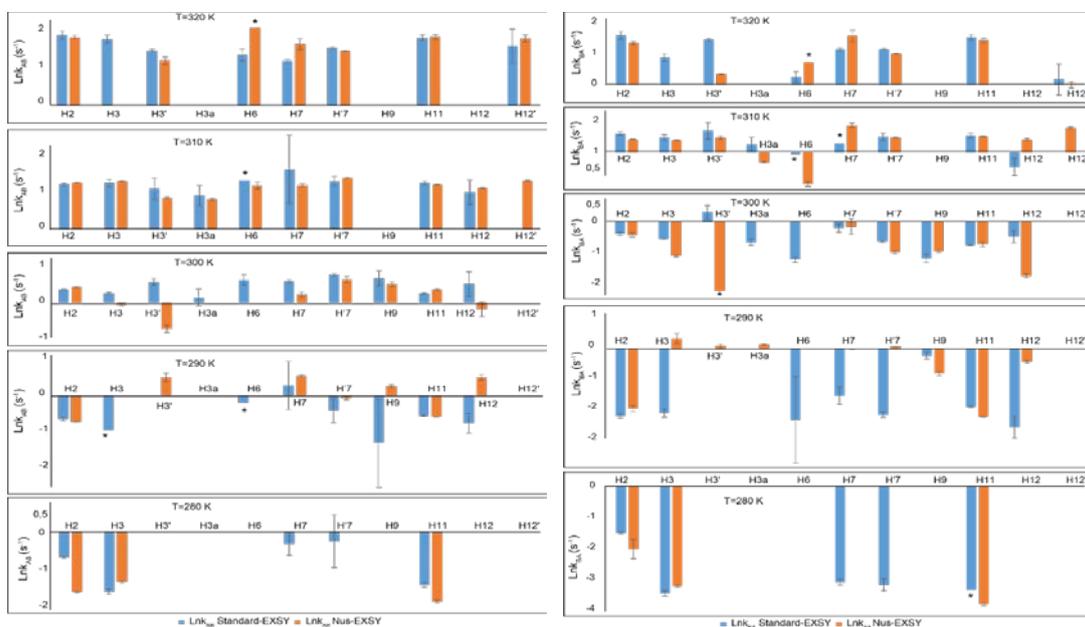


Figure S5. Diagrammes des  $\text{Ln}k_{AB}$  et  $\text{Ln}k_{BA}$  extraits pour les différents sites de protons à 5 températures différentes de 280 à 320 K (EXSY standard-EXSY NUS).





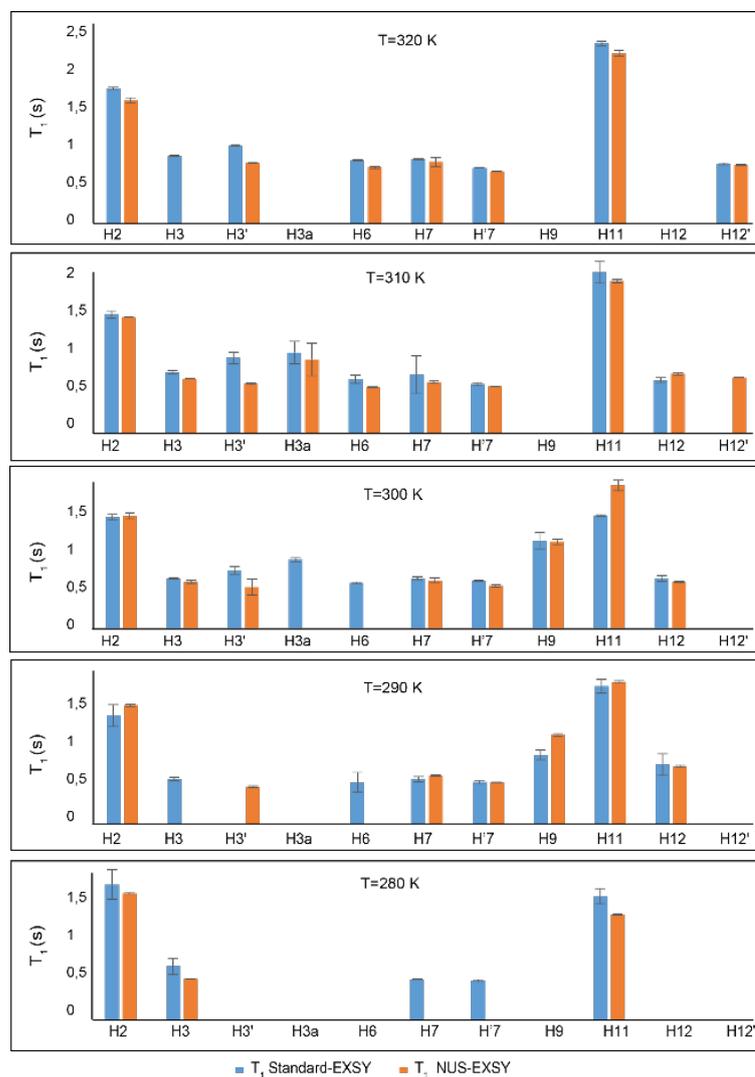


Figure S6. Diagrammes des  $T_1$  extraits pour les différents sites de protons à 5 températures différentes de 280 à 320 K (EXSY standard-EXSY NUS).

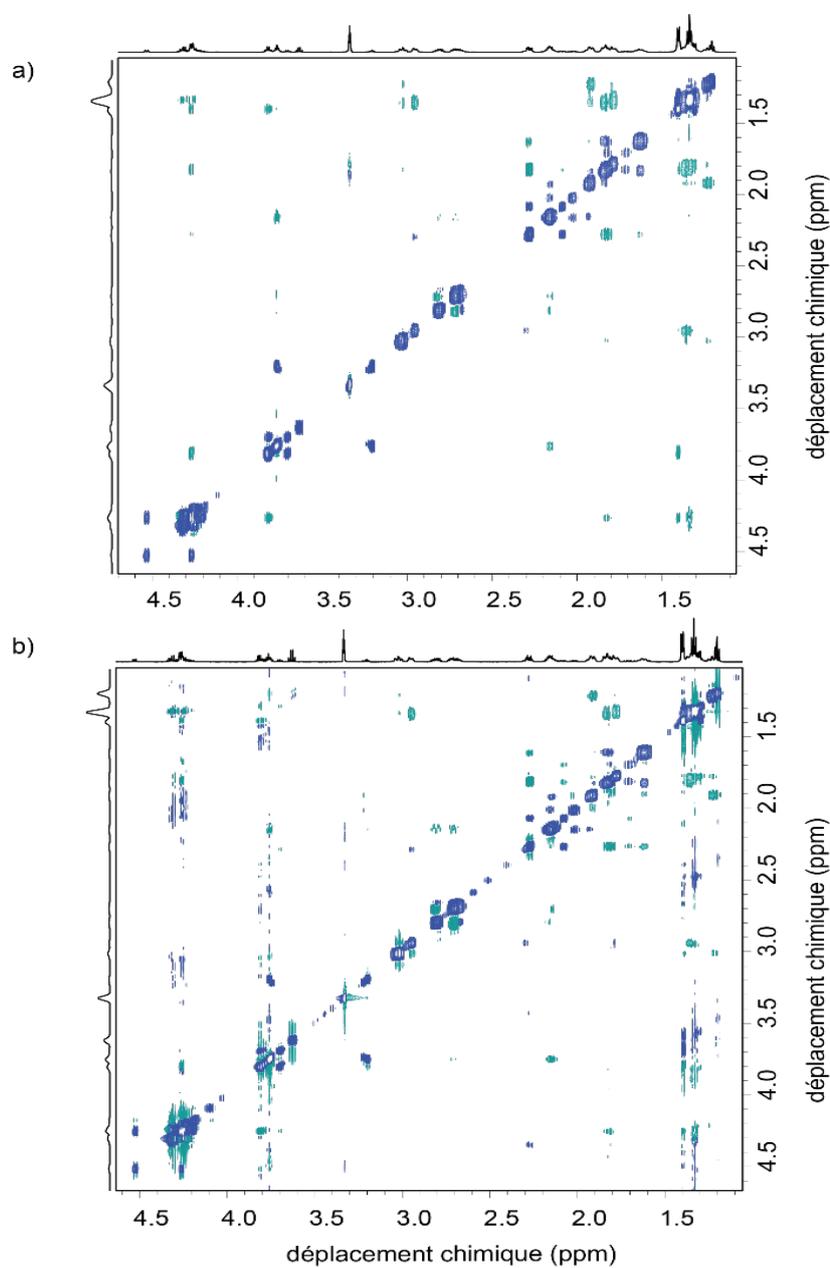
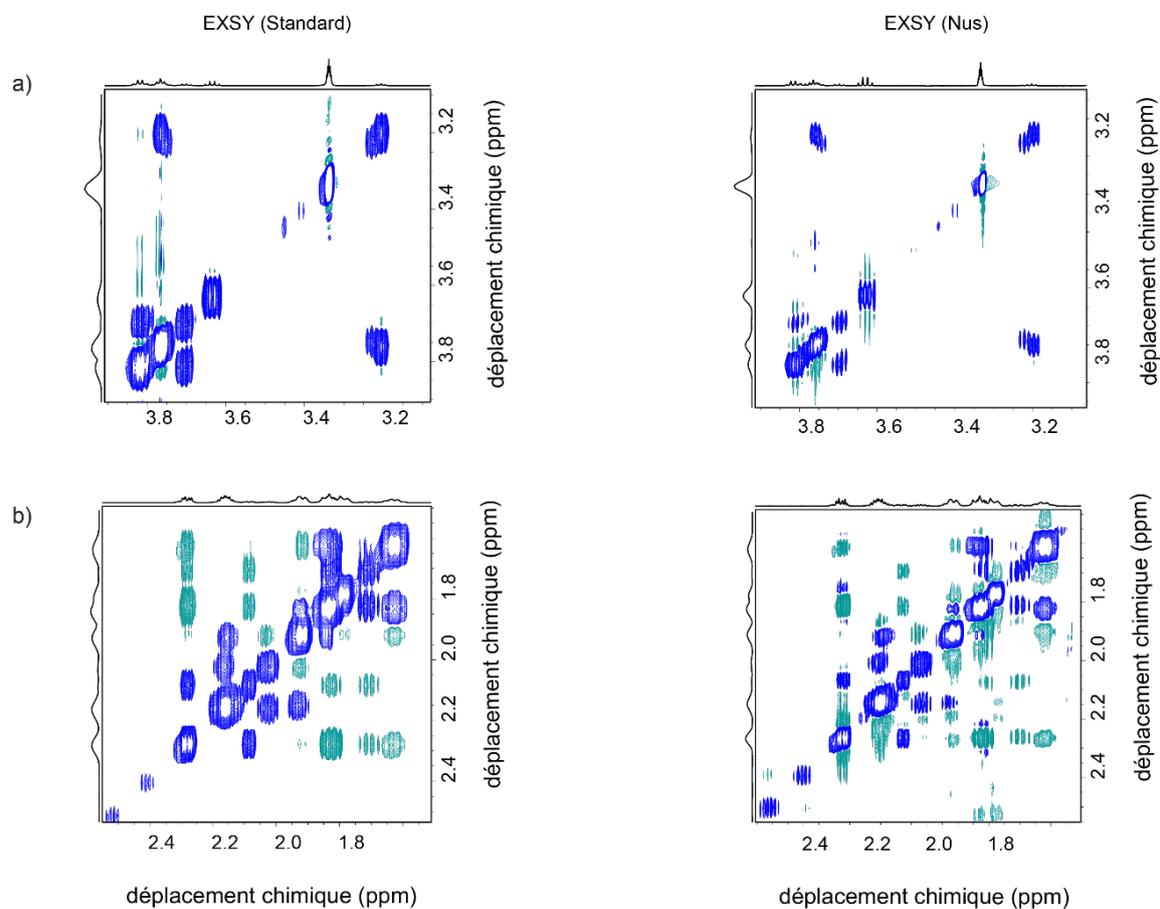


Figure S7. a) Spectre EXSY 2D enregistré en 1h 32 min. (pour  $\tau_m = 1,2$  s ; NS=2) avec un échantillonnage uniforme b) spectre EXSY 2D enregistré en 52 min (pour  $\tau_m = 1,2$  s ; NS=4) avec la méthode d'échantillonnage non uniforme (NUS 25%). La température de l'échantillon a été réglée à 290 K.



**Figure S8. Région sélectionnée des spectres EXSY standard- EXSY NUS enregistrés à 14.1 T en 1h 32 min et 52 min respectivement.**

Tableau .1 Tableau des paramètres d'acquisition des expériences EXSY appliquées au Trandolapril

EXSY	TD (F <sub>3</sub> )	TD (F <sub>2</sub> )	TD (F <sub>1</sub> )	NS	SW (ppm)	IN_F (μs)	D1 (s)	Temps d'analyse
Acqu. Standard (2D)		18K	512	2	13	128	3	<b>1h 32 min</b>
NUS 25% (2D)		18K	512	4	8	208	3	<b>52 min</b>
F2-PSYCHE (Pseudo-3D)	1K	1K	3944	4	7.5	30	1	<b>8h</b>
F1-PSYCHE (2D)		460	14	4	7.5	222	1	<b>14h</b>
F2-ZS (Pseudo-3D)	2K	512	16	4	7.5	30	1.5	<b>1j 6h 22 min</b>

## X. Spectres RMN du maléate d'énalapril

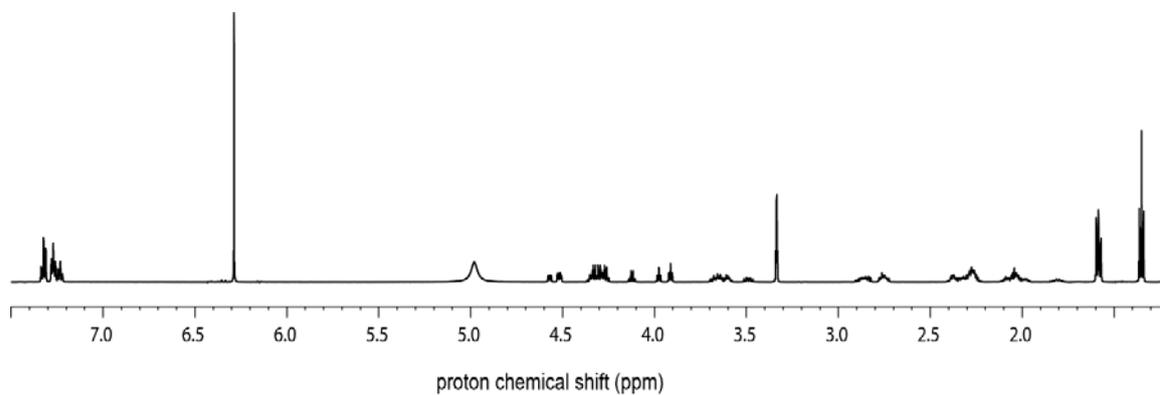


Figure S9. Spectre RMN 1H standard enregistrés sur 15 mg du Maleate d'énalapril dans 600  $\mu$ L de MeOD à 14.T et T=300K

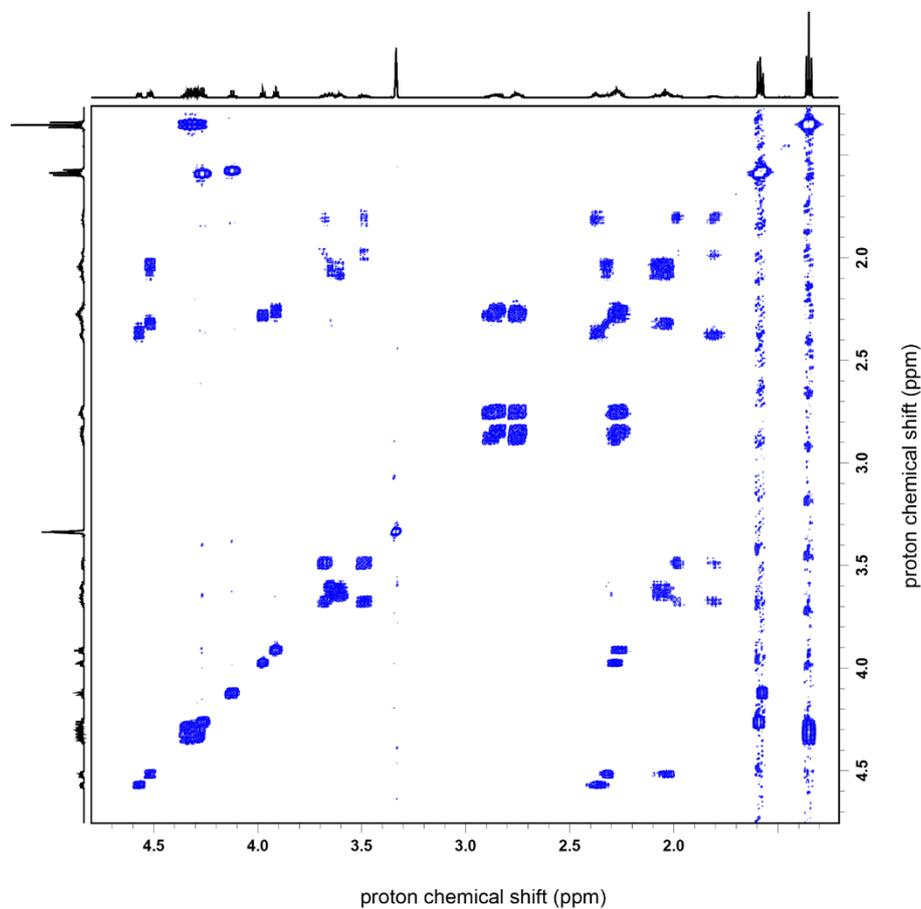


Figure S10. Spectre RMN 2D Cosy 1H-1H enregistré sur 15 mg du Maleate d'énalapril dans Le MEOD à 14.1 T et T= 300 K.

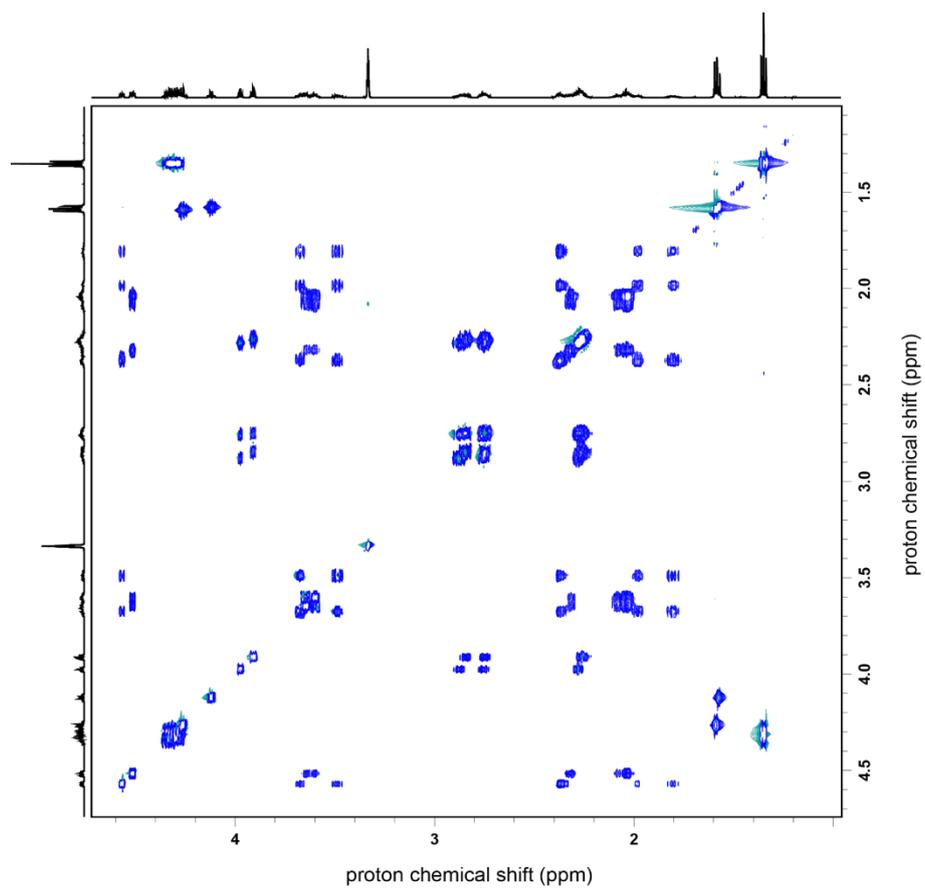


Figure S11. Spectre RMN 2D Tocsy 1H-1H enregistré sur 15 mg du Maleate d'énalapril dans le MEOD à 14.1 T et T= 300 K.

**Titre :** Développements Méthodologiques Pour l'Analyse d'Equilibres Conformationnels par Résonance Magnétique Nucléaire

**Mots clés :** Equilibre Conformationnel, pure shift, PSYCHE, EXSY, RMN

**Résumé** La résonance magnétique nucléaire est une technique de choix pour étudier la dynamique de l'échange dans des composés à portée thérapeutique. Cependant, les spectres acquis avec les méthodes 1D et 2D classiques présentent souvent des recouvrements importants, ce qui rend l'attribution de chaque espèce en échange difficile. Le développement méthodologique d'une approche pure shift permettrait donc d'améliorer la résolution de ces données.

Au cours de cette thèse, nous avons effectué une série de développements méthodologiques des expériences de type EXSY dans lesquelles nous avons mis en œuvre différentes méthodes de découplage homonucléaire, En particulier, deux approches ont été testées :

la méthode PSYCHE appliquée aux dimensions  $F_1$  et  $F_2$  des cartes EXSY, et la méthode Zangger-Sterk en  $F_2$ . Ces approches ont toutes mené à une amélioration significative de la résolution qui nous a permis de caractériser les deux conformères s-cis/s-trans du Trandolapril.

Nous avons également étudié l'intérêt de la technique d'échantillonnage non-uniforme (NUS) du signal pour réduire le temps d'analyse. Cette approche nous a permis de gagner en temps d'analyse, mais la présence d'artefacts à certaines températures suggère que d'autres développements seront encore nécessaires.

Ces résultats ouvrent la voie vers une analyse plus fine du processus d'échange dans des composés présentant un spectre RMN complexe

**Title :** Methodological Developments for the Analysis of Conformational Equilibria by NMR

**Keywords :** Chemical exchange, pure shift, PSYCHE, EXSY, RMN

**Abstract:** Nuclear magnetic resonance is a technique of choice for studying chemical exchange in therapeutic compounds. However, spectra acquired with standard 1D and 2D methods often show spectra with overlapping signals, which makes the assignment of each species difficult. Methodological development of a pure shift approach would therefore make it possible to improve the resolution of these data.

During this thesis, we carried out a series of developments of the EXSY type experiments in

EXSY maps, and the Zangger-Sterk method in  $F_2$ . These approaches all led to significant resolution improvements, allowing us to characterize the s-cis / s-trans conformers in Trandolapril.

We have also studied the interest of non-uniform sampling techniques to reduce the analysis time. This approach allowed us to accelerate the experiment, but the presence of artifacts at various temperatures suggests that further developments will still be needed.

These results pave the way for a more accurate



which we implemented different homonuclear decoupling methods. Two approaches were tested: the PSYCHE method applied to the F1 and F2 dimensions of analysis of the exchange process in compounds with complex NMR spectrum

**Titre :** Développements Méthodologiques Pour l'Analyse d'Equilibres Conformationnels par Résonance Magnétique Nucléaire

**Mots clés :** Equilibre Conformationnel, pure shift, PSYCHE, EXSY, RMN

**Résumé** La résonance magnétique nucléaire est une technique de choix pour étudier la dynamique de l'échange dans des composés à portée thérapeutique. Cependant, les spectres acquis avec les méthodes 1D et 2D classiques présentent souvent des recouvrements importants, ce qui rend l'attribution de chaque espèce en échange difficile. Le développement méthodologique d'une approche pure shift permettrait donc d'améliorer la résolution de ces données.

Au cours de cette thèse, nous avons effectué une série de développements méthodologiques des expériences de type EXSY dans lesquelles nous avons mis en œuvre différentes méthodes de découplage homonucléaire, En particulier, deux approches ont été testées :

la méthode PSYCHE appliquée aux dimensions  $F_1$  et  $F_2$  des cartes EXSY, et la méthode Zangger-Sterk en  $F_2$ . Ces approches ont toutes mené à une amélioration significative de la résolution qui nous a permis de caractériser les deux conformères *s-cis/s-trans* du Trandolapril.

Nous avons également étudié l'intérêt de la technique d'échantillonnage non-uniforme (NUS) du signal pour réduire le temps d'analyse. Cette approche nous a permis de gagner en temps d'analyse, mais la présence d'artefacts à certaines températures suggère que d'autres développements seront encore nécessaires.

Ces résultats ouvrent la voie vers une analyse plus fine du processus d'échange dans des composés présentant un spectre RMN complexe

**Title :** Methodological Developments for the Analysis of Conformational Equilibria by NMR

**Keywords :** Chemical exchange, pure shift, PSYCHE, EXSY, RMN

**Abstract:** Nuclear magnetic resonance is a technique of choice for studying chemical exchange in therapeutic compounds. However, spectra acquired with standard 1D and 2D methods often show spectra with overlapping signals, which makes the assignment of each species difficult. Methodological development of a pure shift approach would therefore make it possible to improve the resolution of these data.

During this thesis, we carried out a series of developments of the EXSY type experiments in which we implemented different homonuclear decoupling methods. Two approaches were

EXSY maps, and the Zangger-Sterk method in  $F_2$ . These approaches all led to significant resolution improvements, allowing us to characterize the *s-cis / s-trans* conformers in Trandolapril.

We have also studied the interest of non-uniform sampling techniques to reduce the analysis time. This approach allowed us to accelerate the experiment, but the presence of artifacts at various temperatures suggests that further developments will still be needed.

These results pave the way for a more accurate analysis of the exchange process in compounds



---

tested: the PSYCHE method applied to the F1 with complex NMR spectrum  
and F2 dimensions of