

La résonance magnétique nucléaire au service de la biologie structurale

Nicolas Birlirakis, François Bontems, Éric Guittet, Jean-Louis Leroy, Ewen Lescop, Alain Louis-Joseph, Nelly Morellet, Christina Sizun et Carine Van Heijenoort

Résumé La résonance magnétique nucléaire (RMN) est l'un des outils de base du chimiste, essentiellement utilisé pour définir la structure des molécules. Elle s'est aussi imposée à partir du milieu des années 80 comme une méthode incontournable pour l'étude des macromolécules biologiques. Les progrès considérables accomplis sur le plan technologique, méthodologique et dans le domaine de la préparation des échantillons permettent à la RMN d'aborder des questions très diverses concernant la conformation spatiale des macromolécules, leurs mouvements et déformations à toutes les échelles de temps, et leurs interactions au sein de complexes stables ou transitoires. De fait, l'usage de la RMN s'est révélé décisif dans de nombreux cas, telle l'étude des protéines amyloïdes ou des complexes transitoires, et a favorisé l'émergence de nouveaux concepts (le rôle de la dynamique des macromolécules et de leurs états faiblement peuplés, l'existence de protéines non structurées).

Mots-clés **RMN du liquide et du solide, biologie structurale, structure, dynamique et interactions des macromolécules.**

Abstract **Nuclear magnetic resonance: a tool for structural biology**
Nuclear magnetic resonance (NMR) is a standard tool in chemistry, essentially used to determine molecular structure. Since the middle of the 80's, NMR has been also widely used to study biological macromolecules. Huge progresses, technological, methodological and on the sample preparation field, has allowed NMR to answer very diverse questions concerning the spatial conformation of the macromolecules, their dynamic and movements at each timescale and their interactions in stable or transient complexes. The use of NMR has been decisive in many cases (the study of amyloid proteins or transient complexes for example) and has favored the emergence of new concepts (the role of the dynamics and the importance of the weakly populated states, the existence of natively unstructured proteins).

Keywords **Liquid or solid states NMR, structural biology, macromolecule structure, dynamic and interactions.**

La résonance magnétique nucléaire (RMN) a un peu plus de soixante-dix ans. On peut en faire remonter la fondation aux travaux d'Isidor Rabi (prix Nobel de physique en 1944) publiés en 1938. Elle a été formalisée dans les années 40 et 50 par Felix Bloch et Edward Purcell en particulier (tous les deux prix Nobel de physique en 1952). L'essentiel de ses bases théoriques est posé en 1961, au moment de la parution du livre d'Anatole Abragam, *Principles of nuclear magnetism* (Clarendon Press, Oxford).

En tant que technique, la RMN intéressa très tôt les chimistes et les biologistes et suscita très rapidement des applications fécondes. En biologie, le premier spectre d'une macromolécule (une protéine : la ribonucléase A) fut enregistré en 1957 [1]. Au début des années 60, on avait déjà constaté qu'un tel spectre ne pouvait se résoudre à la superposition de ceux des acides aminés composant la protéine. En d'autres termes, on avait découvert qu'au-delà de sa composition chimique, la structure tridimensionnelle d'une macromolécule influence son spectre, découverte à la base de nombreuses applications encore d'actualité dans le

domaine du repliement/dépliement des protéines ou de l'étude des interactions entre les macromolécules biologiques et leurs ligands. En 1967, Kurt Wüthrich, mettant à profit l'éclatement particulier du spectre d'un ferrocyclochrome dû à la présence d'un centre paramagnétique, identifia le ligand axial du fer, une méthionine, réalisant ainsi l'une des toutes premières études réellement structurales [2].

C'est cependant un peu plus tard que la RMN acquit toute sa puissance à la suite de deux percées majeures. La première fut la mise au point par Richard Ernst de la RMN dite « impulsionnelle par transformée de Fourier » [3], qui permit à la méthode de gagner considérablement en sensibilité et en rapidité, mais surtout ouvrit la voie au développement en 1975 de la RMN multidimensionnelle par le même Ernst (prix Nobel de chimie en 1991), à partir d'une idée de Jean Jeener [4-5]. La seconde fut l'introduction, en 1980, de l'expérience NOESY, permettant de mesurer des distances entre atomes d'hydrogène au sein d'une molécule, par Anil Kumar, Richard Ernst et Kurt Wüthrich [6].

Les applications furent immédiates et spectaculaires. En 1982, les équipes de Cornelis Hilbers et d'Alfred Redfield réussirent à identifier (attribuer) les fréquences de résonance des protons imino de l'ARN de transfert (tRNA^{Phe}) [7-8]. En 1984, l'équipe de Robert Kaptein réalisa la première attribution de l'ensemble des protons d'un oligonucléotide [9] et publia, en collaboration avec celle de Kurt Wüthrich, l'arrangement dans l'espace des trois hélices du domaine de liaison à l'ADN du répresseur *lac* [10]. En 1985, l'équipe de Kurt Wüthrich publia la première détermination par RMN de la structure tridimensionnelle d'une protéine [11], ce qui lui valut (avec la mise au point de l'expérience TROSY) de recevoir à son tour le prix Nobel de chimie en 2002.

Cependant, si à la suite des travaux de Wüthrich, la RMN devint l'une des deux techniques permettant de résoudre la structure tridimensionnelle des macromolécules biologiques à l'échelle atomique, ce n'est pas son seul apport à la biologie structurale. L'une de ses contributions majeures est certainement d'avoir popularisé l'idée que les macromolécules biologiques sont des objets profondément dynamiques, animés de mouvements à toutes les échelles de temps (de la picoseconde à la minute), et d'avoir donné à la biologie les moyens d'explorer ces mouvements avec une résolution atomique. Une autre contribution essentielle est d'avoir permis l'étude des propriétés structurales de nouvelles classes d'objets, en particulier d'objets labiles, qu'il s'agisse de complexes transitoires, d'états faiblement peuplés, ou plus récemment d'une classe de protéines particulièrement importantes, les protéines intrinsèquement désordonnées.

Les noyaux des atomes : des sondes très performantes

Champs magnétiques, structures et mouvements

La RMN repose sur le fait que les noyaux de certains atomes, à « nombre de spin » non nul, existent dans plusieurs états dont les énergies sont différentes en présence d'un champ magnétique. Le point intéressant, du point de vue de l'utilisation de la RMN en chimie et biochimie, est que la différence d'énergie entre ces états est proportionnelle au champ magnétique affectant le noyau et que ce champ est la somme du champ externe, créé par le spectromètre, et d'un champ local, créé par l'environnement du noyau. Or ce champ local dépend de la nature des substituants de l'atome, mais aussi de celle des groupements chimiques dans son voisinage immédiat, de la façon dont ils sont disposés et dont ils interagissent avec lui. Par ailleurs, la façon dont l'état énergétique du noyau évolue dépend des fluctuations du champ magnétique perçu. Là encore, les fluctuations peuvent être créées par le spectromètre (sous forme d'impulsions de champ), mais sont aussi dues aux mouvements et aux déformations de la molécule. Finalement, la différence d'énergie entre les états d'un noyau dépend aussi de l'état de spin des noyaux qui lui sont chimiquement liés et/ou qui lui sont spatialement proches (*figure 1*).

Chaque noyau magnétiquement actif constitue donc une sonde très sensible du champ magnétique et de ses

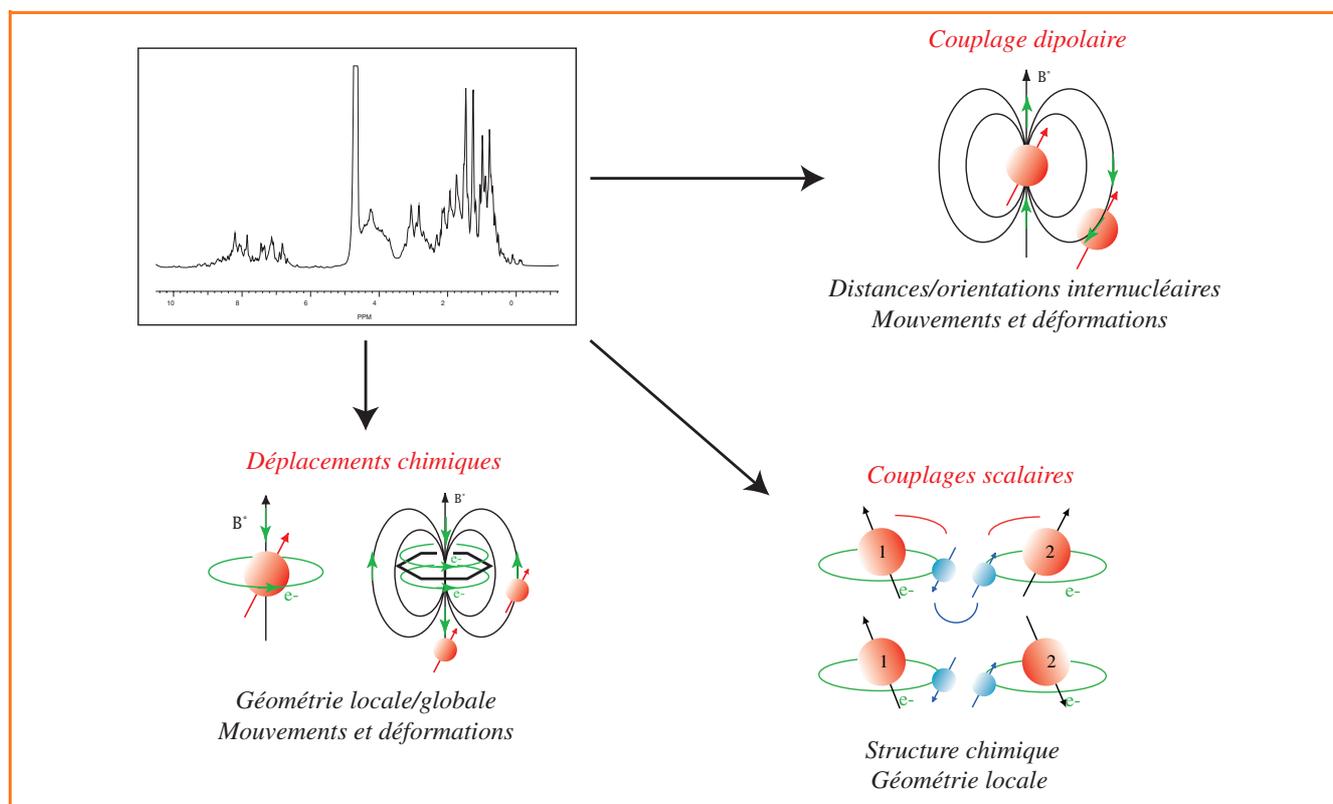


Figure 1 - Chaque raie d'un spectre RMN (ici un spectre proton enregistré à 600 MHz sur une protéine) renseigne sur l'environnement local d'un proton ou d'un groupe de protons.

Cet environnement dépend de la densité électronique autour du noyau et de la présence de courants de cycle dans son voisinage immédiat, qui affectent son déplacement chimique, ainsi que de l'état de spin des autres noyaux proches dans l'espace (couplages dipolaires) ou proches par les liaisons (couplages scalaires). Les déplacements chimiques, les couplages scalaires et les couplages dipolaires, en milieu anisotrope pour ces derniers, renseignent sur la géométrie du système. Par ailleurs, les variations de déplacement chimique et de couplage dipolaire induites par les fluctuations de la géométrie de la molécule vont affecter les processus de relaxation. L'analyse de ces processus va donc renseigner sur la dynamique du système et ce à différentes échelles de temps, selon la nature de l'interaction mise en jeu.

fluctuations dans son environnement proche, paramètres qui dépendent eux-mêmes de la géométrie et de la dynamique locale et globale de la molécule. De plus, le fait que les énergies associées aux états de spin d'un noyau soient affectées par celui des noyaux voisins permet de faire « communiquer » les noyaux et d'établir des relations entre eux (couplages scalaire ou dipolaire). La valeur et les effets des couplages entre deux noyaux sont modulés par leur disposition relative et par leurs mouvements respectifs. Ils renseignent donc eux aussi sur la topologie, la géométrie et la dynamique du système.

La RMN, une technologie en évolution permanente

La force de la RMN est d'autoriser la mesure de toute une série de grandeurs (fréquences de résonance, vitesses de relaxation, valeurs de couplages) dans toute une série de situations, l'analyse de ces grandeurs permettant d'accéder aux paramètres structuraux et dynamiques caractéristiques du système considéré. Pour ce faire, la RMN mobilise des compétences très variées (ce qui est un aspect non négligeable du plaisir qu'il y a à pratiquer cette discipline). Même si les bases fondamentales de la théorie de la RMN ont été posées il y a pratiquement cinquante ans, l'exploitation de cette théorie suscite toujours un travail considérable pour concevoir de nouvelles mesures et de nouveaux moyens d'extraire une information pertinente de ces mesures. D'autre part, les spectromètres de RMN sont des appareils versatiles. Leur fonction est de manipuler les états de spin des noyaux des atomes de façon à créer des configurations d'états particulières, à mesurer leurs énergies et à suivre leurs évolutions. Un aspect important du travail est la mise au point des expériences de mesure, sous forme de « séquences d'impulsions », au niveau du spectromètre. Enfin, la RMN a fait, et continue à faire, l'objet de développements technologiques majeurs. Ainsi, l'intensité des champs magnétiques des spectromètres de RMN à haute résolution, naguère de l'ordre du tesla (correspondant à des fréquences de résonance du proton de 40 à 60 MHz), a été multipliée par plus de 20 (figure 2), le premier spectromètre à 23,5 T (1 000 MHz) ayant été installé récemment en France. Ceci, combiné avec l'amélioration des sondes et, en particulier, avec l'utilisation des cryosondes (dont les bobines et les préamplificateurs sont refroidis à des températures de quelques dizaines de kelvins) a permis une augmentation considérable de la sensibilité. Il est maintenant possible d'étudier une macromolécule à partir d'une dizaine de nanomoles de produit. La RMN a aussi bénéficié de toutes les avancées de l'informatique, permettant ainsi l'enregistrement, le traitement et l'analyse d'expériences à deux, trois, voire quatre dimensions, « pesant » jusqu'à plusieurs centaines de mégaoctets (figures 3 et 4).

Le marquage isotopique, un outil irremplaçable

Un dernier point, essentiel, réside dans la préparation du système biologique que l'on veut étudier. Il peut « simplement » s'agir de la production et de la purification d'une macromolécule dont on veut étudier la structure, mais aussi de la mise en place de systèmes complexes (mélange de partenaires, systèmes réactionnels) dont on veut suivre les propriétés. De ce point de vue, un atout considérable de la RMN vient de ce que seuls certains isotopes des atomes



Figure 2 - En haut : trois des quatre spectromètres du Laboratoire de chimie et biochimie structurales de l'Institut de chimie des substances naturelles (ICSN, UPR 2301 du CNRS) : le 950 MHz, le 800 MHz et, au fond, le 500 MHz. Au milieu et en bas : le 950 MHz vu de face et de dessus.

Au pied de l'aimant, on observe la ligne de transfert d'hélium à 35 K servant à refroidir les bobines et les préamplificateurs de la cryosonde.

communément trouvés dans les molécules biologiques sont observables et qu'ils ont des fréquences de résonance et des caractéristiques spectroscopiques très différentes. On peut se servir de cette propriété pour réaliser des marquages (c'est-à-dire enrichir sélectivement une macromolécule, ou une position dans la macromolécule, en un isotope particulier) et donc suivre (ou effacer) sélectivement une macromolécule (ou une position dans la macromolécule) au sein d'un mélange complexe. On peut par exemple remplacer les protons (noyau le plus abondant de l'atome d'hydrogène, facilement observable en RMN) par des deutérons (observables dans une gamme de fréquences très différente) pour effacer une molécule du spectre proton. On peut aussi, à l'inverse,

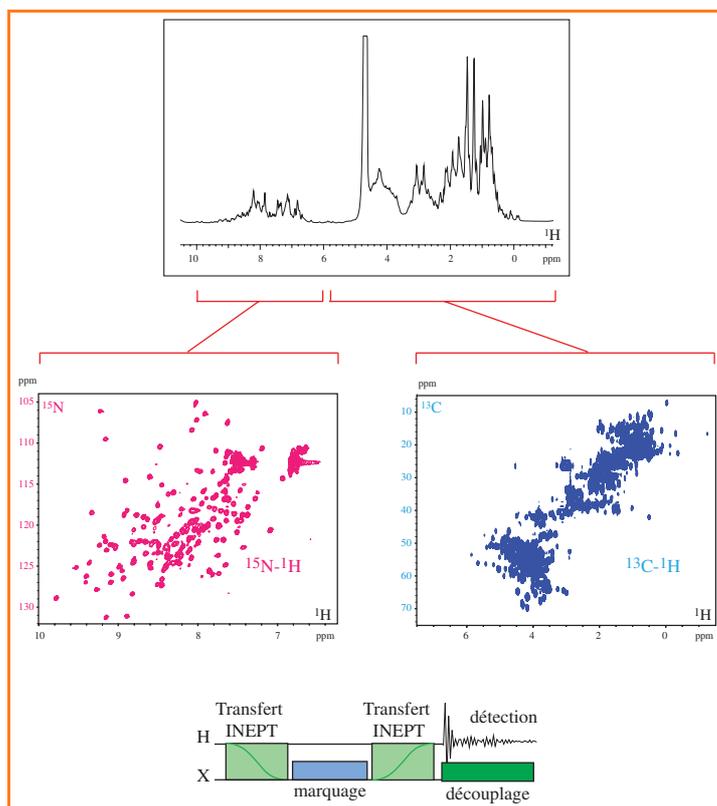


Figure 3 - Du spectre à l'expérience bidimensionnelle.

En haut, spectre typique d'une protéine. Le signal intense à 4,7 ppm est celui, incomplètement supprimé, de l'eau. En deçà de 6 ppm, on observe les protons amide (H-N du squelette et des chaînes latérales), ainsi que les protons portés par les cycles aromatiques. Au-delà, on observe les protons portés par les carbones non aromatiques. Ce spectre contient une très grande quantité d'information structurale, mais est très difficilement exploitable du fait du très grand nombre de signaux qu'il contient. En dessous sont représentés deux spectres HSQC (« heteronuclear single quantum coherence ») enregistrés sur cette protéine. Le premier est le spectre de corrélation proton-azote. Il corréle les fréquences de résonance des azotes du squelette et de certaines chaînes latérales (dimension verticale) avec les fréquences des protons qui leur sont liés (dimension horizontale). Le second est le spectre de corrélation proton-carbone aliphatique. L'expérience HSQC peut se décomposer, comme indiqué par le schéma du bas, en quatre blocs : un bloc de transfert (dit INEPT) de l'aimantation des protons vers les azotes/carbones (selon l'expérience réalisée) par l'intermédiaire des liaisons chimiques les reliant, un bloc de marquage, permettant d'encoder la fréquence des azotes/carbones, un second bloc de transfert permettant de ramener l'aimantation des azotes/carbones, toujours par l'intermédiaire des liaisons chimiques, et finalement un bloc de détection de l'aimantation portée par les protons.

remplacer les carbones 12 (non observables) et azotes 14 (difficilement observables) normalement trouvés dans les molécules biologiques par des carbones 13 et des azotes 15 (facilement observables) pour sélectionner une molécule particulière dans un mélange. La mise au point des stratégies de marquage est donc un aspect central de la préparation des expériences (figures 3 et 4).

Résoudre la structure des macromolécules et caractériser leurs interactions, surtout lorsqu'elles sont faibles

La RMN, une technique complémentaire de la radiocristallographie...

En 1985, l'équipe de Wüthrich démontrait qu'il était possible d'utiliser la RMN pour résoudre la structure atomique d'une protéine, le « bull seminal proteinase inhibitor IIA » (figure 5), offrant ainsi une alternative à la radiocristallographie. Il s'agissait d'une toute petite protéine (57 acides aminés) très stable et très soluble. Vingt-cinq ans

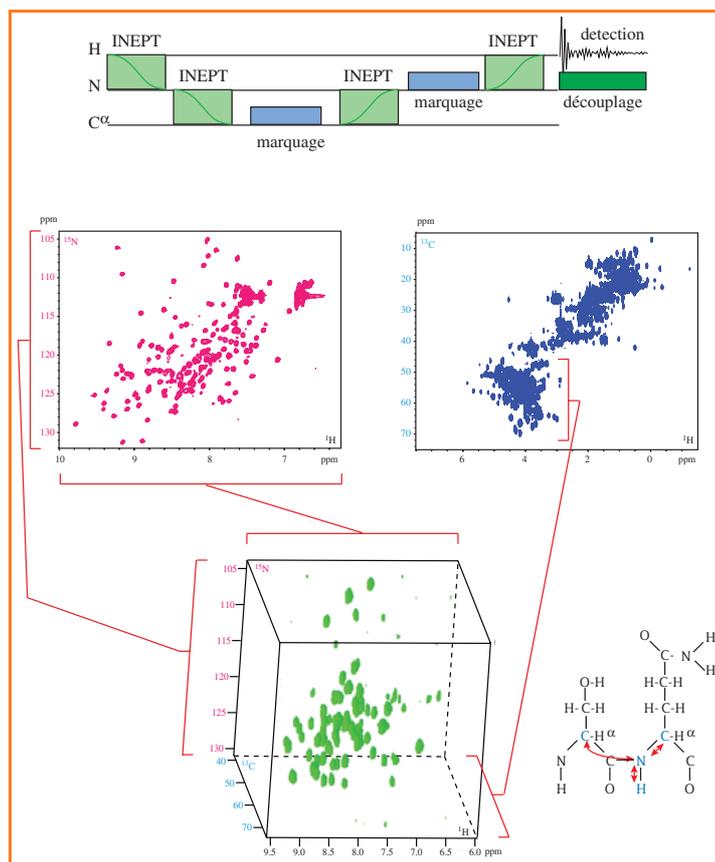


Figure 4 - De l'expérience bidimensionnelle à l'expérience tridimensionnelle.

L'expérience proposée est une HNCA. Elle permet de corréler trois fréquences entre elles : celles d'un proton amide, de l'azote qui lui est chimiquement lié et de l'un ou l'autre des deux carbones α liés à l'azote (soit le C^α du même acide aminé, directement lié à l'azote, soit le C^α de l'acide aminé précédent, lié à l'azote par l'intermédiaire du carbonyle). La séquence d'impulsion permettant de réaliser cette expérience est construite sur le même principe que celle de l'HSQC : l'aimantation est transférée, par des blocs INEPT, du proton vers l'azote auquel il est lié, puis de cet azote vers les deux C^α adjacents. Les fréquences des C^α sont encodées, l'aimantation est retransférée vers les azotes, dont les fréquences sont à leur tour encodées, puis vers les protons amides où l'aimantation est détectée. Après transformée de Fourier, le spectre obtenu se présente sous la forme d'un cube dont l'une des dimensions correspond aux fréquences des protons amides, la seconde à celle des azotes amides et la troisième aux C^α .

plus tard, environ cinq mille structures de macromolécules ont été déterminées par RMN et déposées à la « protein data bank » (PDB*) de Brookhaven. La plupart correspondent à de petites molécules (moins de 15 kDa), mais certaines correspondent à de gros objets (figures 5 et 6 p. 104).

Il est peu probable que la RMN puisse jamais conduire à la reconstruction de structures aussi impressionnantes que celle du ribosome, par exemple. Mais le progrès des spectromètres, des séquences d'acquisition et des programmes de traitement en font une technique extrêmement efficace dans le cas des petites protéines (moins de 15 kDa) en permettant d'en résoudre la structure en quelques semaines de travail. Par ailleurs, la RMN trouve toute sa justification dans le cas des objets peu ou pas structurés ou possédant une très forte dynamique interne (certaines protéines, les acides nucléiques ou les polysaccharides), mais aussi des complexes labiles ou des fibres amyloïdes par exemple.

... particulièrement adaptée à l'étude des complexes labiles...

Le cas des complexes labiles illustre bien la force de la RMN. Les complexes transitoires, où les partenaires

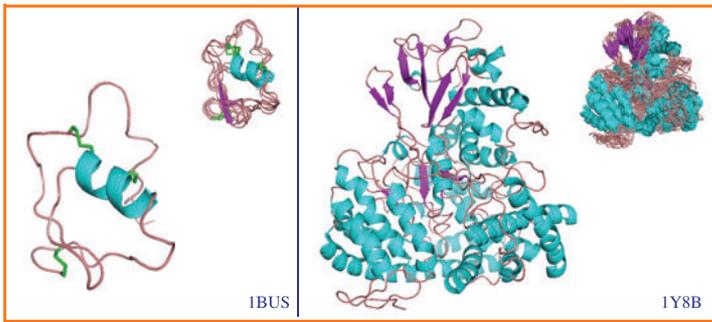


Figure 5 - Première structure de protéine résolue par l'équipe de Kurt Wüthrich en 1985 (1BUS) et structure de la « malate synthase G », une enzyme monomère de 82 kDa (723 acides aminés) résolue par l'équipe de Lewis Kay en 2004 (1Y8B). Nous avons utilisé une représentation schématique dite « en ruban » qui permet de mettre l'accent sur l'organisation de la molécule. Dans le cas des protéines, elle fait apparaître les hélices α en cyan, les brins β en mauve et les boucles en orange. Les chaînes latérales ne sont pas représentées. L'habitude en RMN est de calculer et de déposer dans les banques de données un ensemble de structures compatibles avec les données expérimentales. La plus ou moins grande variabilité observée entre les structures dans l'ensemble permet en effet d'apprécier la précision du résultat, reflet de la quantité d'informations dont on dispose sur chaque région de la molécule. Nous avons donc représenté, pour chaque molécule, une structure ainsi que la superposition des structures de l'ensemble déposé. Les structures sont désignées par leur code d'accèsion PDB* (« protein data bank »).

1BUS : il s'agit d'un inhibiteur de protéases, isolé du plasma séminale de taureau. Cette protéine est formée de 57 acides aminés. Sa structure est fortement rigidifiée par la présence de trois ponts disulfures (en vert sur la figure). La précision de la structure n'est pas très bonne, mais permet néanmoins de définir l'organisation globale de la molécule et de mettre en évidence la présence d'une hélice α et d'un petit feuillet β à deux brins. **1Y8B** : la taille de la molécule impose que les expériences de RMN soient enregistrées sur des échantillons ne possédant qu'un petit nombre de protons, typiquement les ^1H du squelette ou les protons des méthyles des chaînes latérales, les autres étant remplacés par des deutérons. Dans ces conditions, le nombre de contraintes géométriques mesurables est faible, ce qui explique l'assez grande variabilité observée dans l'ensemble de structures. La qualité est néanmoins suffisante pour définir correctement la position de tous les éléments de structure (hélice et feuillet). Une structure plus précise de la même protéine a par ailleurs été obtenue en rajoutant des données de diffusion des rayons X en solution (SAXS).

n'interagissent que pendant une fraction du temps, sont généralement difficiles à cristalliser. Par ailleurs, une structure figée, telle qu'elle peut être stabilisée lors du processus de cristallogénèse, peut conduire à une surévaluation des contacts entre les partenaires. L'intérêt de la RMN réside dans ce qu'un échange rapide entre les formes libres et associées des partenaires facilite l'analyse de leurs interactions et dans ce que la technique peut, dans certains cas, fournir des informations précieuses sur les processus mis en œuvre lors de la formation du complexe, au-delà de sa structure.

La stratégie d'étude, dans le cas de deux macromolécules en interaction, est classiquement de marquer l'un des deux partenaires avec un isotope observable de l'azote (^{15}N) et/ou du carbone (^{13}C) et de mesurer la façon dont l'autre affecte son signal. Une analyse simple mais puissante est la « cartographie de déplacement chimique » (« chemical shift mapping »), qui consiste à suivre l'évolution des fréquences de résonance de la molécule marquée en présence de quantités croissantes de son partenaire. Comme l'avaient déjà mis en évidence les travaux des pionniers de la RMN, les fréquences de résonance sont très sensibles à l'environnement des atomes et permettent donc de localiser les régions de la molécule affectées par l'interaction (figure 7). Il faut cependant remarquer que la définition de ces expériences est faible. Un atome peut être affecté lors d'une interaction sans appartenir à la région de contact entre les partenaires du fait d'un changement structural induit à distance. Pour pallier ce problème, d'autres expériences plus sophistiquées peuvent être réalisées. Il est possible de faire du « transfert de saturation », ce qui impose cependant de deutérer complètement la molécule que l'on veut regarder,

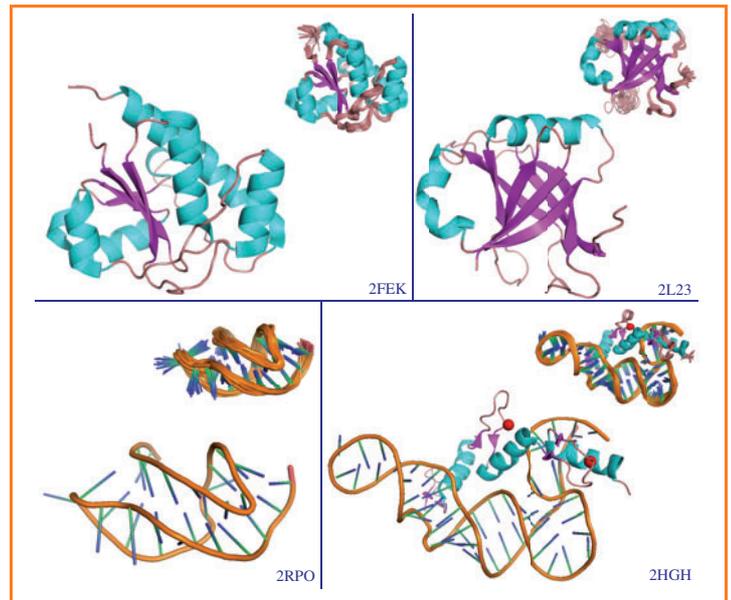


Figure 6 - Structures de macromolécules (deux protéines, un ARN, un complexe ARN/protéine) résolues par RMN.

2FEK et **2L23** : structures de deux protéines de 18 kDa, la tyrosine phosphatase WZB d'*E. coli* (167 acides aminés) et le tonneau β du domaine ACID de la protéine Med25 humaine (160 acides aminés). **2RPO** : structure d'un « pseudo-nœud » d'ARN de 27 bases impliqué dans le décalage de cadre de lecture programmé (« programmed ribosomal frameshifting ») d'un ARN messager du virus PEMV-1. S'il n'est pas aussi facile de produire des ARN que des protéines, les progrès accomplis par les différentes techniques disponibles (ici la transcription *in vitro*) permettent aujourd'hui d'obtenir des quantités d'ARN marqués à l'azote ^{15}N et/ou au carbone ^{13}C compatibles avec des études structurales poussées. **2HG** : structure du complexe formé par les trois « doigts à zinc » du facteur de transcription TFIIIA (87 acides aminés) et d'un fragment de l'ARN ribosomal 5S (55 bases). Là encore, l'obtention d'une structure de qualité est en grande partie due aux progrès réalisés dans le domaine du marquage des ARN.

Nous avons utilisé les mêmes conventions de représentation que dans la figure 5. Dans le cas des acides nucléiques, le squelette ribose-phosphate est représenté en orange, les bases en vert et bleu.

ou d'analyser l'influence de l'interaction sur les vitesses de relaxation dans la molécule étudiée. Une seconde difficulté vient de ce qu'en supposant que l'on ait parfaitement caractérisé les régions en contact dans les deux partenaires, cette information est fortement dégréinée : on ne connaît pas les points en vis-à-vis dans les deux surfaces. On peut essayer de contourner cette difficulté en utilisant des programmes de calculs qui vont rechercher les solutions les plus vraisemblables sur la base de la complémentarité des propriétés physico-chimiques des surfaces définies par la RMN, ou en essayant d'exploiter de façon plus complète l'information disponible (par exemple en essayant de recalculer les valeurs précises des perturbations de fréquences). On peut aussi essayer de mesurer quelques distances précises entre les deux molécules dans le complexe. La RMN fournit là encore des outils de choix. L'un des plus performants, qui nécessite cependant de faire un peu de biochimie, consiste à accrocher une sonde paramagnétique en un point d'un des partenaires (en liant cette sonde à une cystéine dans le cas d'une protéine ou en introduisant un nucléotide modifié dans le cas d'un acide nucléique). L'analyse des perturbations induites par cette sonde permet en effet de la positionner de façon précise dans le complexe (figure 8).

... et au criblage des interactions protéines-ligands

Un cas particulier de ces études est l'analyse des interactions entre macromolécules et petits ligands. La RMN fournit en effet des outils très puissants pour identifier le site

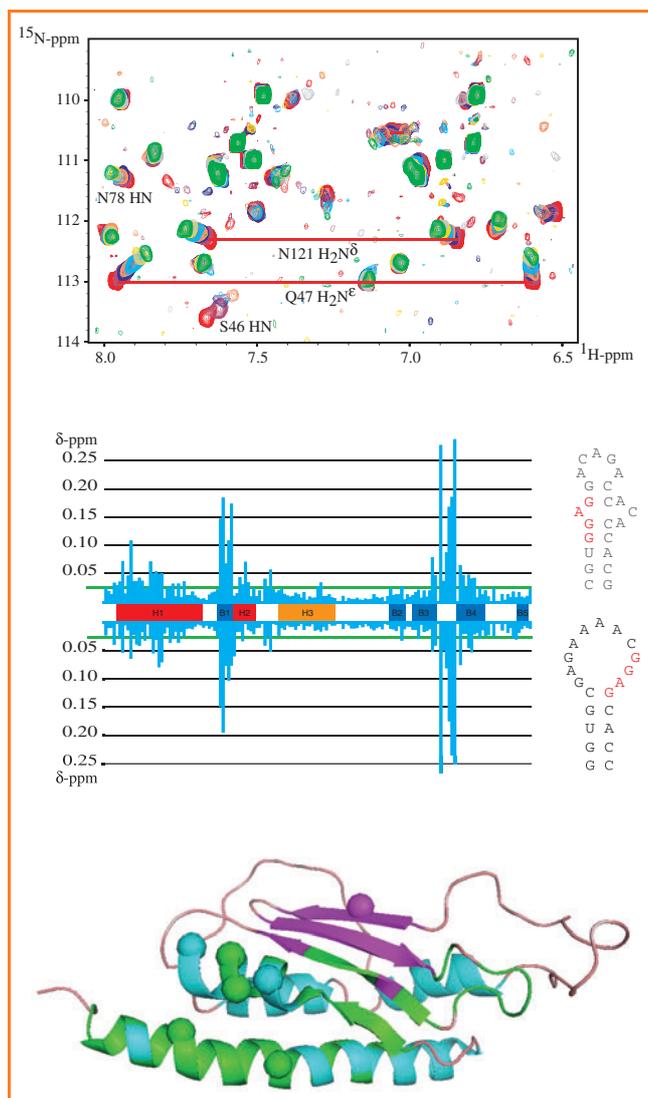


Figure 7 - Étude du site de liaison aux ARN de la ribonucléase RegB du bactériophage T4 [18].

Cette ribonucléase est capable de cliver les deux molécules d'ARN représentées au milieu de la figure avec des efficacités très différentes. La première n'est clivée qu'en présence d'un cofacteur (la protéine S1 du ribosome d'*E. coli*), tandis que la seconde est clivée par RegB seule. Le site de liaison a été caractérisé par cartographie des déplacements chimiques. Une série de spectres ^{15}N -HSQC a été enregistrée sur la protéine en présence de concentrations croissantes d'ARN. Un extrait de ces spectres est présenté en haut. Certaines corrélations restent rigoureusement identiques à elles-mêmes, tandis que d'autres se déplacent (ce qui est caractéristique d'un échange rapide). La quantification des variations observées, au centre, montre que l'effet des deux ARN est très semblable ce qui indique qu'ils lient l'enzyme de la même façon. La zone d'interaction des deux ARN, reportée en vert sur la protéine, coïncide avec la position de résidus dont la mutation entraîne l'inactivation de l'enzyme (sphères à la position de C $^{\alpha}$ des résidus concernés).

d'interaction d'une petite molécule à la surface d'une macromolécule ou pour identifier, au sein d'un mélange de petites molécules, celles qui sont susceptibles d'interagir, même avec une affinité faible, avec une protéine particulière. Or il s'agit là de deux enjeux considérables dans l'identification et/ou la conception rationnelle de molécules thérapeutiques (bioactives, de façon générale). L'identification de la région d'interaction d'une petite molécule sur une protéine se fait en employant les stratégies précédemment évoquées : essentiellement en suivant les variations des fréquences de résonance de la macromolécule en présence et en absence du ligand. Les efforts, dans ce cadre, portent sur la sensibilité et la rapidité des expériences utilisées de façon à pouvoir faire du criblage à haut débit. Les principales avancées sont venues

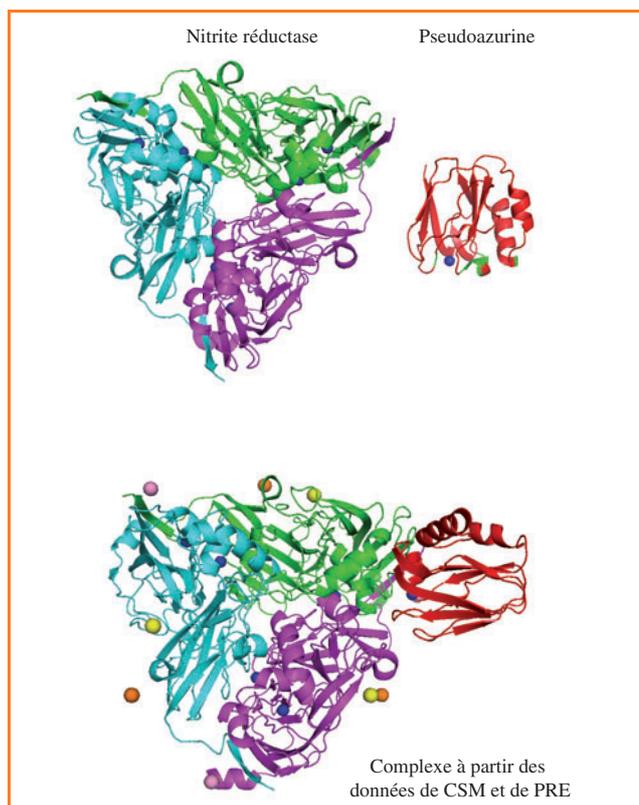


Figure 8 - Reconstruction du complexe transitoire pseudoazurine (en rouge, ion cuivre en bleu, 123 acides aminés), nitrite réductase (trimère en vert, cyan et mauve, ion cuivre en bleu, 3 x 339 acides aminés), d'après [19]. La constante d'affinité entre les deux protéines est faible (50 μM) et les deux partenaires sont en échange rapide. Le site de fixation de la nitrite réductase sur la pseudoazurine a été caractérisé par cartographie des déplacements chimiques (les résidus les plus affectés dans l'expérience sont en vert sur la représentation de la pseudoazurine). Trois sites de liaison au gadolinium ont été introduits sur chaque monomère de la nitrite réductase, en mutant deux résidus voisins en cystéine et en s'en servant pour fixer un chélatant des lanthanides, le CLaNP-1 (sphères jaunes, oranges et roses). Les vitesses de relaxation transverse (R_2) des protons de la pseudoazurine ont été mesurées en présence d'un ion gadolinium dans chacun des trois sites. La pseudoazurine a été positionnée de façon à mettre en contact chacun des acides aminés identifiés par la cartographie de déplacement chimique avec un acide aminé de la nitrite réductase et de façon à reproduire les vitesses de relaxation mesurées pour chaque site.

des sondes utilisées, refroidies à très basse température (cryosondes), de façon à améliorer la sensibilité de détection, permettant de travailler sur de tout petits échantillons (nanosondes) ou de réaliser des mesures en flux continu.

De l'autre côté, lorsqu'il s'agit d'identifier le ou les ligands potentiels d'une macromolécule au sein d'un mélange complexe, toute une série de paramètres peuvent être suivis ou utilisés comme filtres, dans la mesure où leurs valeurs sont très différentes dans le cas d'une petite molécule libre ou en interaction avec la macromolécule. Les plus utilisés vont être la largeur de raie (plus précisément la vitesse de relaxation transverse), qui croît avec la taille des objets en solution, le coefficient de diffusion latérale, qui diminue avec la taille du complexe, ou le transfert d'aimantation depuis la macromolécule ou depuis des molécules d'eau associées à la macromolécule vers le ligand (figure 9). Il est possible aussi de réaliser des expériences dites de « NOE transféré » permettant de caractériser la structure géométrique du ligand à la surface de la macromolécule. Il est à signaler cependant que la plupart de ces techniques ne fonctionnent pas dans le cas d'interactions fortes. Elles vont donc être particulièrement bien adaptées à la recherche de ligand simple de faible affinité, pouvant constituer un point de départ à la mise au

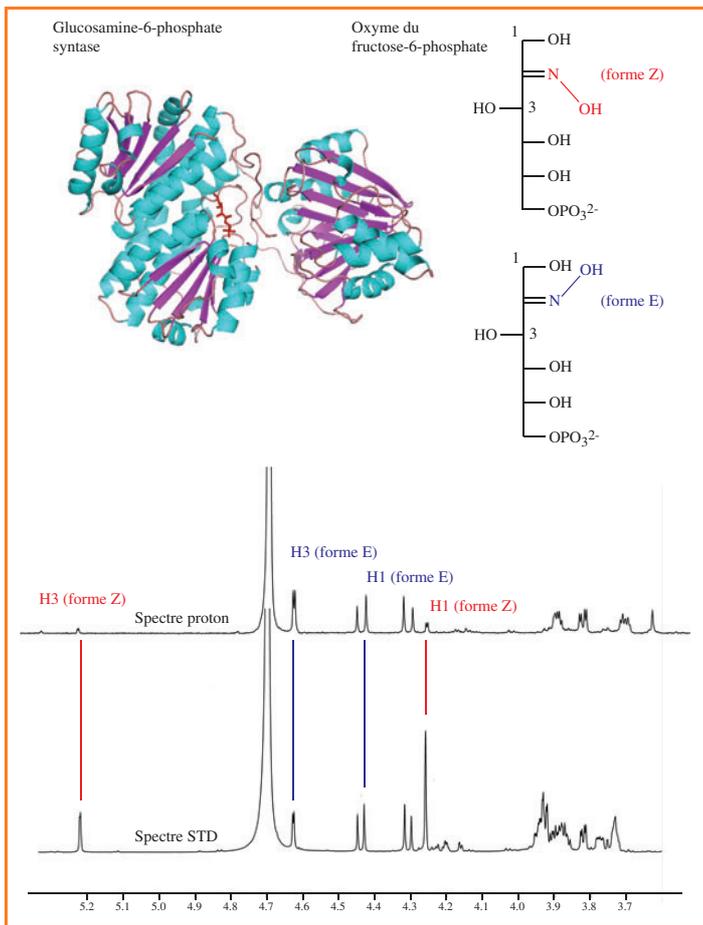


Figure 9 - Identification d'un inhibiteur potentiel de la glucosamine-6-phosphate synthase (thèse d'Olivier Serve, Université Paris 11, 2008, en collaboration avec Bernard Badet, ICSN).

La Glns (2BPL, représentée « en ruban ») catalyse la transformation du fructose-6-phosphate (en rouge dans le site actif de l'enzyme) en glucosamine-6-phosphate. Cette enzyme est une cible potentielle d'antibiotiques, mais aussi d'antidiabétiques. Les oxymes du fructose-6-phosphate présentés peuvent servir de point de départ à la synthèse de nouveaux inhibiteurs de l'enzyme. La question se pose néanmoins de savoir si les deux isomères interagissent de la même façon avec la protéine. La protéine (50 μM) a été incubée en présence de cent équivalents du mélange des deux oxymes. Un spectre proton et un spectre « STD » ont été enregistrés. Le spectre STD est obtenu en faisant la différence entre un spectre pendant lequel les protons de la protéine sont sélectivement irradiés (à 0,8 ppm) et un spectre de référence où l'irradiation est réalisée loin des signaux attendus (à 28 ppm). La comparaison du spectre proton de l'oxyme et du spectre de différence montre que les protons H1 et H3 de la forme *cis* (Z) sont spécifiquement affectés. Seule cette forme semble donc interagir avec l'enzyme.

point de molécules plus affines. C'est ainsi que la RMN s'est imposée comme une technique incontournable dans le cas d'une méthode en plein développement, dite « approche par fragment », qui vise à rechercher des groupements fonctionnels simples de petites tailles interagissant avec une cible donnée, et à localiser leurs zones de contact à la surface de la cible de façon à s'en servir pour reconstituer des molécules plus complexes et plus affines.

La RMN du solide, une technique pour étudier les gros systèmes

Une technique destinée à pallier la réduction ou l'absence de mouvements

Les techniques de RMN en phase liquide permettent, comme nous venons de le voir, d'étudier de façon simple et performante les propriétés structurales des macromolécules et de leurs assemblages. L'efficacité de la méthode provient,

en grande partie, de ce que dans un liquide, la réorientation isotrope rapide des molécules (avec des temps caractéristiques inférieurs à quelques nanosecondes) limite ou annule certains effets des interactions entre atomes, ce qui permet d'avoir des spectres simples dont les raies sont fines et bien résolues. Une limite de la méthode tient *a contrario* en ce que le ralentissement de la réorientation des objets (lié à l'accroissement de leur taille par exemple) ou la restriction de leur mouvement (comme dans une membrane) s'accompagnent d'un élargissement des raies et/ou d'une complexification du spectre due à la réapparition des effets anisotropes. Il est cependant possible de supprimer ces phénomènes en faisant tourner l'échantillon autour d'un axe incliné à $54,7^\circ$ du champ magnétique (« l'angle magique ») à une fréquence de l'ordre de grandeur de celle des interactions que l'on souhaite moyennner. Des séquences de recouplage sont ensuite utilisées pour réintroduire sélectivement certaines interactions. Moyennant la résolution de « quelques » problèmes techniques, cette technique, appelée RMN MAS (« magic angle spinning »), permet donc de s'affranchir de la taille de l'objet.

Un exemple d'étude : les fibres impliquées dans les maladies neurodégénératives

La RMN du solide reste encore essentiellement une affaire de méthodologistes. Cela dit, l'apparition de spectromètres à haut champ dédiés à cette technique, l'amélioration substantielle des têtes de mesure tant sur le plan mécanique qu'au niveau de l'électronique et le développement de nombreuses séquences d'impulsions spécifiques ont considérablement favorisé le développement de ce domaine ces dix dernières années. En biologie, cette technique permet actuellement d'étudier la structure de petites protéines à l'état microcristallin, mais elle s'est surtout révélée un outil irremplaçable pour l'étude des protéines membranaires ou des fibrilles insolubles impliquées dans les maladies neurodégénératives.

De nombreuses protéines peuvent changer de structure et passer de leur conformation normale (native) à une conformation sous laquelle elles forment de longues fibres, dites fibres amyloïdes. La formation de ces fibres est associée à de nombreuses maladies neurodégénératives (Parkinson, Alzheimer), aux maladies à prion (Creutzfeldt-Jakob), mais aussi à certains diabètes, par exemple. Ces objets sont difficiles à étudier dans la mesure où ce sont des solides insolubles (donc inaccessibles à la RMN du liquide) possédant une structure organisée non cristalline (ne pouvant donc pas être étudiée en radiocristallographie). Dans ces conditions, la RMN du solide s'est révélée la technique d'analyse idéale. Elle permet d'accéder à des mesures assez semblables à celles obtenues en RMN du liquide (fréquence de résonance des atomes dans la molécule, mesure de distances et d'orientations) qui ont permis de reconstituer l'architecture d'un certain nombre de ces fibres, montrant par là même qu'elles partagent une même organisation (deux nappes superposées de brins étendus d'une dizaine d'acides-aminés) (figure 10), mais sont susceptibles de nombreuses variations. L'utilisation conjointe d'expériences de RMN du solide et du liquide a aussi permis de montrer que la formation des fibres ne mobilise qu'une région des protéines impliquées, le reste restant désorganisé et flexible. Une observation importante a été de remarquer que même si une protéine peut former différents types de fibres, une fibre semble toujours homogène, ce qui suggère un processus de nucléation suivi

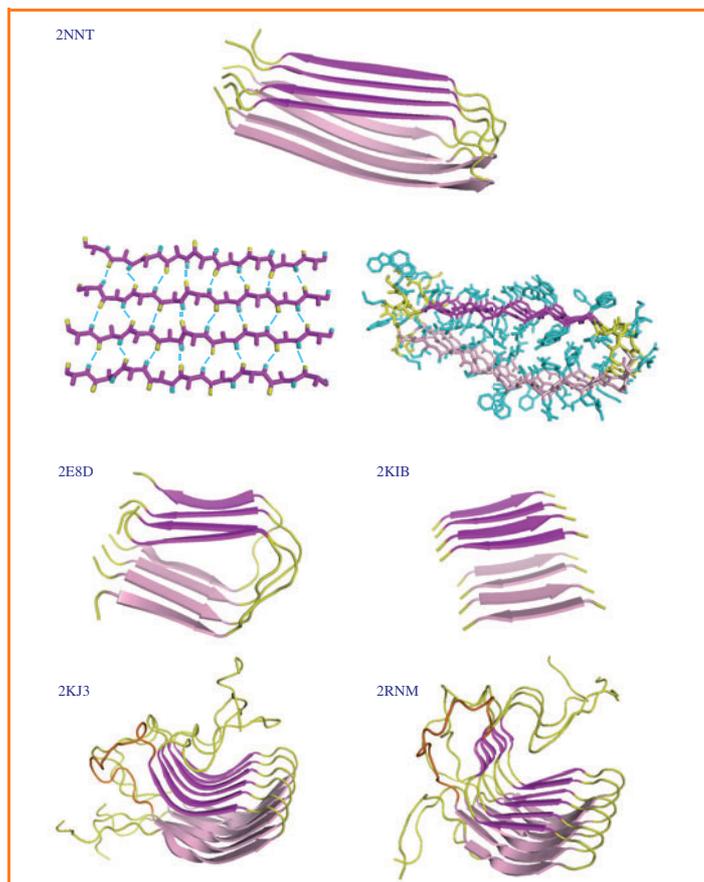


Figure 10 - Organisation de fibres amyloïdes déterminée par RMN du solide.

2NNT : une fibrille « classique » formée par le second domaine WW de la protéine humaine CA150, un activateur transcriptionnel impliqué, avec l' Huntingtine, dans la chorée d'Huntington. Chaque protéine contribue à la formation de la fibrille par l'intermédiaire de deux brins β non natifs (n'existant pas dans la structure normale de la protéine) empilés l'un sur l'autre et séparés par une boucle plus ou moins structurée (les deux brins sont en rose et en mauve, la boucle est en jaune dans la représentation en ruban adoptée en haut). Les paires de brins β s'associent entre elles pour former deux feuillets β parallèles, maintenus par un ensemble de liaisons hydrogènes entre les H^N et les O du squelette (en cyan et jaune sur la vue de gauche). La structure est stabilisée par les contacts hydrophobes entre les chaînes latérales des brins superposés et des brins adjacents (en cyan sur la vue de droite). **2E8D** : fibrille formée par le fragment K3 (Ser20-Lys41) de la β 2-microglobuline, protéine du système immunitaire impliquée dans l'amylose des patients hémodialysés. Cette fibrille possède la même architecture que celle formée par la protéine CA150 mais présente une structure différente. **1KJ3** et **2RNM** : deux structures de la fibrille formée par la région 218-289 de la protéine prion HET-s du champignon *Podospora anserina*. Sous sa forme prion, cette protéine joue un rôle dans les processus de reconnaissance de soi/non-soi. Les deux principales différences avec la structure canonique présentée précédemment sont d'une part que chaque protéine contribue pour deux paires successives de brin β , reliées par une longue boucle non structurée (en orange) et d'autre part par l'existence d'un décalage de phase au niveau du brin du dessous (en fait, deux brins séparés par deux résidus) correspondant à l'existence d'un cœur hydrophobe dense « en triangle ». **2KIB** : fibrille formée par un décapeptide de la protéine humaine iAPP impliquée dans le diabète de type 2. La caractéristique de cette structure est que chaque protéine est impliquée dans la formation d'un (et non de deux) brins β et que les différentes paires de brins sont disposées de façon antiparallèle les unes aux autres.

d'une elongation, cette elongation se faisant selon le schéma du nucléus. Il a là encore été possible d'identifier les intermédiaires de formation de ces fibres et de montrer que les espèces toxiques, responsables des pathologies, sont en réalité ces intermédiaires et non les fibrilles formées en fin de processus [12].

Un accès privilégié aux mouvements et à la dynamique des macromolécules

En 1975, Kurt Wüthrich et Gerhard Wagner analysèrent l'évolution en fonction de la température des fréquences de

résonance des protons des cycles aromatiques d'une petite protéine, le BPTI [13]. Ils montrèrent de cette façon que certains des noyaux aromatiques de cette protéine sont animés d'un mouvement de « flip-flop » à la température ambiante, résultat qui surprit dans la mesure où les données de radiocristallographie conduisaient plutôt à considérer ces chaînes latérales comme les mieux définies et les moins mobiles de la structure. Cette étude contribua à ouvrir la voie à l'idée que les macromolécules ne sont pas des objets rigides mais présentent des degrés de flexibilité non négligeables.

Les mouvements des macromolécules

Il est maintenant admis que les macromolécules sont animées de mouvements à toutes les échelles de temps (figure 11). Dans le cas des protéines, cela va des oscillations rapides des atomes ou de petits groupes d'atomes autour de leurs positions d'équilibre, dans la gamme de la picoseconde, aux processus du repliement, dans la gamme de la milliseconde à la minute, en passant par des mouvements concertés de groupes d'acides aminés, de régions ou de domaines les uns par rapport aux autres, dans la gamme de la nano-, micro- ou milliseconde. La mise en évidence de ces mouvements a conduit à de nombreuses questions, concernant en particulier leur rôle. Les mouvements rapides, par exemple, ont pu être considérés comme un simple bruit thermique (les atomes bougent parce que la mécanique du système l'impose, sans que cela ait le moindre effet sur l'activité biologique). Mais il est aussi possible que ces mouvements constituent un « réservoir d'entropie » permettant un ajustement fin de l'énergie libre de certains processus (de reconnaissance par exemple). Cette mise en évidence a surtout conduit à une redéfinition de la notion même de structure, qui a cessé d'être un état unique pour devenir une distribution d'états diversement peuplés. Cela s'est accompagné de la mise en place de nouveaux champs d'étude, comme celui des protéines ne possédant pas de structures bien définies (les « protéines intrinsèquement dépliées » ou PID), ou celui des états faiblement peuplés, pouvant jouer un rôle essentiel dans l'activité biologique d'une molécule, ainsi que de l'introduction de nouveaux concepts, comme l'idée que la participation de molécules structurées par fragments à une interaction permettait d'en ajuster indépendamment la spécificité et l'affinité.

Les mouvements en RMN

L'étude des mouvements par la RMN repose sur le fait, comme nous l'avons dit plus haut, que les valeurs des grandeurs mesurables en RMN dépendent non seulement du champ magnétique perçu par chaque atome, mais aussi des fluctuations de ce champ qui peuvent être induites par les mouvements et déformations des molécules. La grande force de la RMN vient de ce que les différentes grandeurs mesurables vont être différemment affectées en fonction des différentes échelles de temps auxquelles peuvent correspondre les fluctuations. Il est donc possible de construire des expériences permettant de caractériser plus ou moins simplement et plus ou moins directement ces différentes échelles de temps [14]. Par ailleurs, la plupart de ces techniques permettent de caractériser des fluctuations autour d'un état moyen ou de définir les paramètres cinétiques des transitions entre plusieurs états structuraux observables. Cependant, l'une d'entre elles est devenue incontournable ces dernières années dans la mesure où elle

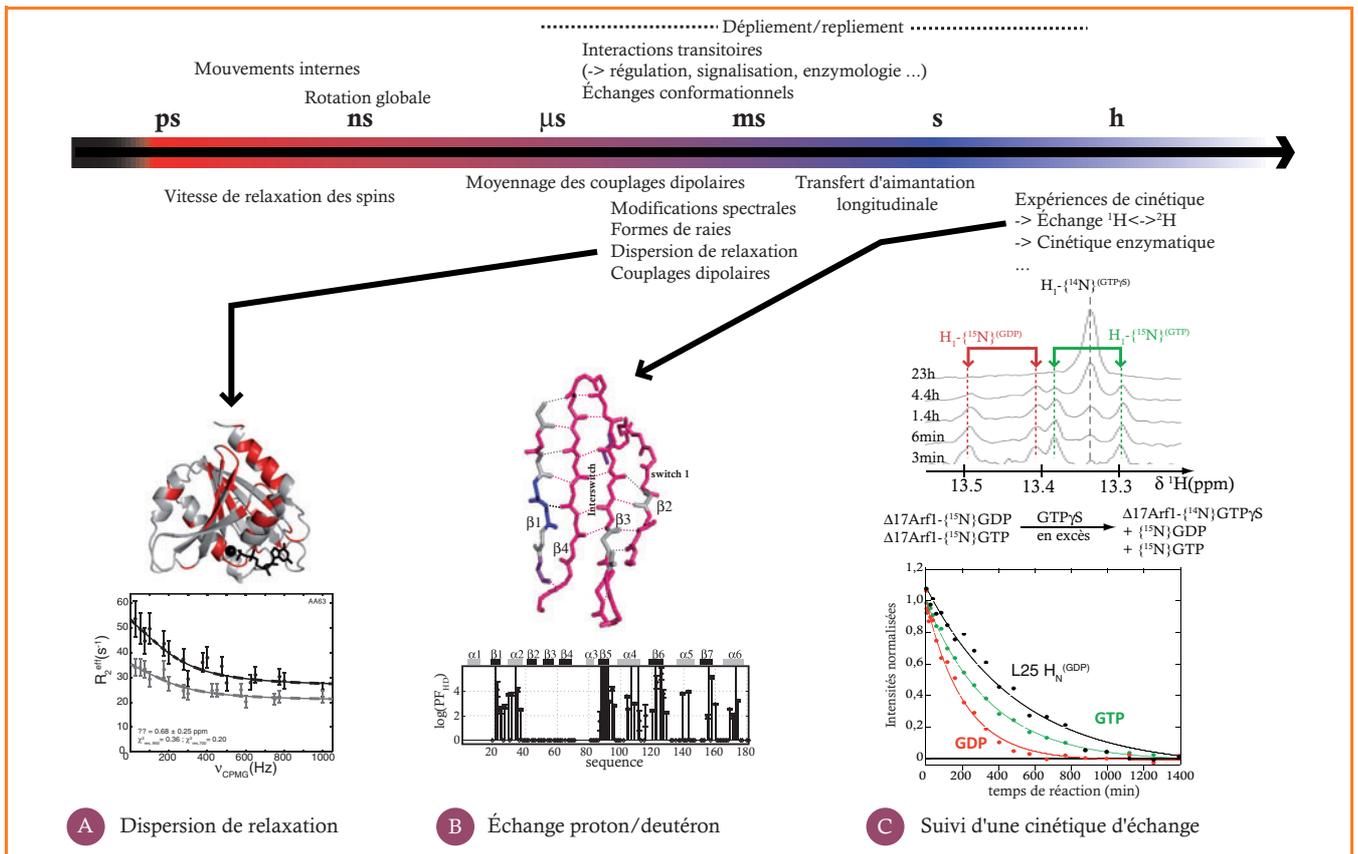


Figure 11 - Analyse des mouvements à différentes échelles de temps.

La gamme des échelles de temps des mouvements accessibles par RMN est montrée en haut de la figure. Quelques types de mouvements et de processus biologiques associés sont présentés au-dessus et quelques méthodes permettant de les caractériser sont indiquées au-dessous. Trois de ces méthodes sont illustrées dans le cas de la petite protéine G Arf1 [19], qui change de conformation selon qu'elle est liée au GTP ou au GDP. Ces changements impliquent, en particulier, un remaniement important du feuillet β présent dans la protéine.

A) Les expériences de dispersion de relaxation permettent de caractériser les mouvements à l'échelle de la milliseconde (de la centaine de microsecondes à quelques millisecondes). Dans le cas d'Arf1, les mesures réalisées sur les azotes ^{15}N à 700 (courbes en gris) et 950 MHz (en noir) mettent en évidence la présence de mouvements importants le long des brins β de la protéine, suggérant l'existence de « voies de communication » entre les différentes régions affectées par le passage de la forme GTP à la forme GDP le long de ces brins.

B) La caractérisation de l'échange, sur quelques dizaines de minutes, entre les hydrogènes amides (H^{N}) labiles de la protéine et ceux du solvant est réalisée en dissolvant la protéine protonée dans de l'eau lourde (D_2O). On peut ainsi mesurer le facteur de protection de chaque hydrogène amide, défini comme le rapport de la vitesse d'échange de l'hydrogène dans la protéine à celui d'un hydrogène porté par le même type d'acide aminé dans un peptide non structuré. Les résultats obtenus sur Arf1 tronquée de son hélice N-terminale et liée au GDP ($\Delta 17\text{Arf1-GDP}$) montrent que les hydrogènes amides du feuillet formé par les brins $\beta 2$ - $\beta 3$ - $\beta 4$ - $\beta 1$ ont des facteurs de protection faibles (s'échangent rapidement). Cela indique que les liaisons hydrogène entre les brins (en pointillés roses sur la figure) sont fragilisées et que le feuillet doit pouvoir s'ouvrir transitoirement.

C) Suivi de l'échange, sur plusieurs heures, entre les deux nucléotides (GDP et GTP) se liant à Arf1. L'état initial est un mélange des deux formes de la protéine (liée au GDP et au GTP). La protéine et les deux nucléotides sont marqués à l'azote 15. À $t = 0$, un excès de GTP γS (non marqué) est ajouté dans l'échantillon. Sur les extraits de spectres proton collectés au cours du temps, on constate la disparition des doublets caractéristiques des protons H1 couplés à l'azote ^{15}N des nucléotides GDP et GTP liés à la protéine. Leur disparition est corrélée à l'apparition d'un singulet correspondant au H1 du nucléotide modifié GTP γS non marqué. L'échange de nucléotide est associé à un important changement de conformation d'Arf1, qui induit des modifications des déplacements chimiques des protons amides de la protéine pouvant être suivis soit sur le spectre proton (exemple de L25 sur la figure), soit sur une HSQC ($^1\text{H}, ^{15}\text{N}$). Les résultats indiquent que le changement de conformation est plus lent que l'échange de nucléotide, ce qui suggère la présence d'états intermédiaires de haute énergie dans le mécanisme de changement de conformation de la protéine.

Globalement, l'ensemble des résultats obtenus montre que la protéine tronquée de son hélice N-terminale (forme mimant la protéine liée à la membrane) est douée de mouvements sur une gamme de temps très large. Ces mouvements mettent en place une communication entre la zone de la protéine proche de la membrane et le site d'échange du nucléotide. La caractérisation des mouvements sur différentes échelles de temps permet de mieux comprendre comment l'échange de nucléotide et le changement de conformation associé, conduisant la protéine dans sa conformation active liée au GTP, sont initiés par les facteurs d'échange nucléotidique.

permet d'accéder aux caractéristiques d'un état excité (peu peuplé) à partir de l'observation d'un état fondamental (majoritairement peuplé) lorsque ces deux états sont en équilibre (en échange conformationnel l'un avec l'autre) dans une gamme de temps adéquate.

Voir l'invisible

Il peut être important d'étudier les états structuraux minoritaires des macromolécules

Il est généralement admis aujourd'hui, et la RMN a largement contribué à établir ce résultat, qu'une

macromolécule en solution n'existe généralement pas dans un état structural unique, mais plutôt sous la forme d'une distribution d'états plus ou moins différents et plus ou moins peuplés. Une idée peut-être moins répandue, mais qui fait son chemin, est que les états minoritaires peuvent être importants, voire essentiels, pour l'activité biologique. Dans le cas des interactions protéines-ligands par exemple, deux modèles peuvent être envisagés : celui d'un « ajustement induit » et celui d'une « sélection conformationnelle ». Or si dans le premier cas, l'état biologique pertinent pour comprendre l'interaction est l'état majoritaire de la protéine, dans le second cas, il peut s'agir d'un état minoritaire. De même, dans le cas des protéines intrinsèquement dépliées, il est possible que la protéine se lie à sa cible dans une

conformation aléatoire avant d'acquiescer sa structure définitive, mais il est aussi possible qu'une faible proportion de la protéine, reconnue par la cible, préexiste dans la conformation finale. Dans le second cas, il s'agira, là encore, de mettre en évidence et d'analyser les propriétés d'un état minoritaire [15].

Un second problème, voisin, est l'étude des « complexes de rencontre ». De nombreux processus biologiques (reconnaissance d'une région « opérateur » à la surface de l'ADN par un effecteur transcriptionnel, transfert d'électrons entre protéines d'oxydo-réduction...) imposent de postuler l'existence de complexes de rencontre mal définis et hautement dynamiques au sein desquels les partenaires vont évoluer/diffuser rapidement entre de nombreuses conformations jusqu'à atteindre leur état actif. Là encore, l'étude des propriétés des nombreux états minoritaires, en équilibre avec l'état actif au sein du complexe, est essentielle à la compréhension du processus biologique.

L'étude des états minoritaires par RMN est un domaine en plein développement

On peut, bien sûr, chercher à mettre en évidence et à étudier les formes minoritaires en essayant de les stabiliser, mais cela va imposer de perturber, physiquement ou chimiquement, le système. On peut aussi, et il s'agit d'un champ expérimental en plein essor, essayer de suivre une molécule unique et donc son évolution entre ses différents états, mais cela reste limité à des observables ponctuelles. Des travaux récents tendent à montrer que la RMN peut fournir des outils permettant d'accéder à l'étude des populations d'états et, dans certains cas, à la caractérisation d'états minoritaires au sein de ces populations. Il s'agit encore de méthodes en développement, mais elles semblent très prometteuses.

Une première voie d'accès tire parti de ce que la précision de certaines mesures et la validité des équations décrivant ces mesures sont suffisantes pour permettre de valider (ou d'invalider) des modèles faisant intervenir des populations d'états. Un exemple typique est l'utilisation de sondes paramagnétiques pour l'étude des complexes de rencontre [16]. L'utilisation de telles sondes permet de mesurer avec précision un grand nombre de distances au sein d'un complexe. Par ailleurs, l'effet est suffisamment intense à faible distance et décroît suffisamment vite avec la distance pour que la présence de sous-populations influe sur les mesures sans que celles-ci soient affectées par les partenaires libres. Dans ces conditions, en utilisant plusieurs jeux de mesures et en combinant les résultats avec des données de modélisation moléculaire, il semble possible de caractériser, dans certains cas, des ensembles d'états.

Une autre façon d'aborder le problème est de remarquer que la plupart des grandeurs mesurables en RMN sont sensibles à l'existence d'équilibres et peuvent renseigner sur les états en équilibre, même lorsque ceux-ci ne peuvent être observés/distingués directement. Par ailleurs, certaines de ces grandeurs peuvent être affectées notablement, même lorsque l'un des deux états est très minoritaire (quelques %). C'est en particulier le cas de la vitesse de relaxation transversale (R_2). L'étude de l'évolution de cette vitesse de relaxation à travers les expériences dites de « dispersion de relaxation » permet dans certains cas favorables d'accéder à des paramètres structuraux (différences de déplacement chimique entre les états), thermodynamiques (populations des états) et cinétiques (constante d'échange entre les états)

de l'équilibre. L'exploitation de ces données a permis de caractériser des états très minoritaires dans des équilibres et, par exemple, de valider la théorie de la « sélection conformationnelle » dans le cas d'interactions enzymes/substrats ou d'étudier les caractéristiques d'intermédiaires structuraux dans les problèmes de dénaturation/renaturation [17].

Conclusion

Au cours des cinquante dernières années, la RMN a contribué à changer profondément nos conceptions sur la nature et le fonctionnement des macromolécules biologiques. Elle s'est révélée être un outil très versatile et très puissant en continuant son renouvellement. La RMN permet en effet de s'intéresser à de très nombreuses observables, constituant autant de voies d'accès aux propriétés physiques des macromolécules. Sa théorie est par ailleurs très bien comprise et très bien formalisée, ce qui permet une exploitation puissante des résultats obtenus. Même si certaines expériences ne peuvent être correctement réalisées (et interprétées) que par des équipes très spécialisées, d'autres sont accessibles en routine à un vaste public et leur réalisation peut être comparée à l'enregistrement d'un spectre de dichroïsme circulaire, tout en fournissant une masse considérable d'informations à l'échelle atomique.

Par ailleurs, la RMN participe d'un mouvement général dans les sciences de la vie en s'intégrant de plus en plus au sein de stratégies d'études pluridisciplinaires. Elle est complémentaire de la radiocristallographie pour la détermination de structures. Elle peut compléter une étude structurale (quelle que soit la technique de détermination utilisée) en fournissant des informations inégalables sur la dynamique et les interactions potentielles du système. Elle peut aussi être combinée à la diffusion des rayons X aux petits angles (SAXS) pour étudier l'architecture de complexes supramoléculaires. Cependant, dans la mesure où la RMN permet par elle-même une étude et une description des macromolécules et de leurs interactions et assemblages selon une très grande diversité d'axes (structuraux, dynamiques, cinétiques, thermodynamiques), elle constitue, nous semble-t-il, un point de vue privilégié d'analyse des propriétés du vivant à l'échelle moléculaire et atomique. Les progrès constants de la RMN nous permettent d'envisager de lever rapidement le voile sur bien des mystères encore cachés des constituants cellulaires.

Note et références

- * PDB, « protein data bank » (www.pdb.org). Pour ne pas charger la liste des références, nous n'avons pas indiqué les publications correspondant aux structures présentées. Elles peuvent être trouvées dans les fichiers PDB (les codes d'accèsion PDB des structures sont indiqués en bleu dans le texte).
- [1] Saunders M., Wishnia A., Kirkwood J.G., The nuclear magnetic resonance spectrum of ribonuclease, *J. Am. Chem. Soc.*, **1957**, *79*, p. 3289.
- [2] Wüthrich K., High-resolution proton nuclear magnetic resonance spectroscopy of cytochrome, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1969**, *63*, p. 1071.
- [3] Anderson W.A., Ernst R.R., Impulse resonance spectrometer including a time averaging computer and a Fourier analyzer, US patent N° 3.475.680, filed May 26, 1965, issued Oct 28, 1969.
- [4] Jeener J., Ampere International Summer School, Basko Polje, Yougoslavie, **1971** (non publié).
- [5] Aue W.P., Bartholdi E., Ernst R.R., Two-dimensional spectroscopy. Application to nuclear magnetic resonance, *J. Chem. Phys.*, **1976**, *64*, p. 2229.
- [6] Kumar A., Ernst R.R., Wüthrich K., A two-dimensional nuclear Overhauser enhancement (2D NOE) experiment for the elucidation of complete proton-proton cross-relaxation networks in biological macromolecules, *Biochem. Biophys. Res. Com.*, **1980**, *95*, p. 1.
- [7] Heerschap A., Haasnoot C.A.G., Hilbers C.W., Nuclear magnetic resonance studies on yeast tRNA^{Phe} I. Assignment of the iminoproton resonances of the acceptor and D stem by means of nuclear Overhauser effect experiments at 500 MHz, *Nuc. Acid Res.*, **1982**, *10*, p. 6981.

- [8] Roy S., Redfield A.G., Assignment of the imino proton spectra of yeast phenylalanine transfer ribonucleic acid, *Biochemistry*, **1983**, *22*, p. 1386.
- [9] Scheek R.M., Boelens R., Russo N., van Boom J.H., Kaptein R., Sequential resonance assignments in ¹H NMR spectra of oligonucleotides by two dimensional NMR spectroscopy, *Biochemistry*, **1984**, *23*, p. 1371.
- [10] Zuiderweg E.R., Billeter M., Boelens R., Scheek R.M., Wüthrich K., Kaptein R., Spatial arrangement of the three alpha helices in the solution conformation of the *E. coli* lac repressor DNA-binding domain, *FEBS Lett.*, **1984**, *174*, p. 243.
- [11] Williamson M.P., Havel T.F., Wüthrich K., Solution conformation of proteinase inhibitor IIA from bull seminal plasma by ¹H nuclear magnetic resonance and distance geometry, *J. Mol. Biol.*, **1985**, *182*, p. 295.
- [12] Karpinar D.P., Balija M.B., Kügler S., Opazo F., Rezaei-Ghaleh N., Wender N., Kim H.Y. *et al.*, Pre-fibrillar alpha-synuclein variants with impaired beta-structure increase neurotoxicity in Parkinson's disease models, *EMBO J.*, **2009**, *28*, p. 3256.
- [13] Wüthrich K., Wagner G., NMR investigation of the dynamics of the aromatic amino acid residues in the basic pancreatic trypsin inhibitor, *FEBS Lett.*, **1975**, *50*, p. 265.
- [14] Palmer A.G. III, NMR characterization of the dynamics of biomacromolecules, *Chem. Rev.*, **2004**, *104*, p. 3623.
- [15] Boehr D.D., Dyson J., Wright P.E., An NMR perspective on enzyme dynamics, *Chem. Rev.*, **2006**, *106*, p. 3056.
- [16] Clore G.M., Iwahara J., Theory, practice and applications of paramagnetic relaxation enhancement for the characterization of transient low-population states of biological macromolecules and their complexes, *Chem. Rev.*, **2009**, *109*, p. 4108.
- [17] Neudecker P., Lundström P., Key L.E., Relaxation dispersion NMR spectroscopy as a tool for detailed studies of protein folding, *Biophys. J.*, **2009**, *96*, p. 2045.
- [18] Odaert B., Saïda F., Aliprandi P., Durand S., Créchet J.B., Guérois R., Laalami S., Uzan M., Bontems F., Structural and functional studies of RegB, a new member of a family of sequence-specific ribonucleases involved in mRNA inactivation on the ribosome, *J. Biol. Chem.*, **2007**, *282*, p. 2019.
- [19] Buosi V., Placial J.P., Leroy J.L., Cherfields J., Guittet E., van Heijenoort C., *J. Biol. Chem.*, **2010**, *285*, p. 37987.
- [20] Vlasie M.D., Fernandez-Busnadiego R., Prudêncio M., Ubbink M., Conformation of pseudoazurin in the 152 kDa electron transfert complex with nitrite reductase determined by paramagnetic NMR, *J. Mol. Biol.*, **2008**, *375*, p. 1405.

PRC

Prévention du risque chimique



Substances dangereuses et
CMR, procédés, CLP, REACH...

CNRS - PRC, 2011 - Illustration: Eric Menneteau, unité de Prévention du risque chimique

Notre équipe vous accompagne dans l'évolution du contexte de la sécurité chimique.

Expertise et conseil

Appui scientifique et technique.

Formation

Inter et intra-entreprises, à la carte, initiale et continue, à destination des secteurs publics et privés.

Communication

Information sur le risque chimique, conception de documents spécifiques.

PRC est une unité de service de l'Institut de chimie du CNRS

www.prc.cnrs-gif.fr



www.cnrs.fr



CNRS - PRC
Bât. 11 - Avenue de la Terrasse
91198 Gif-sur-Yvette cedex
Tél. : 01 69 82 32 67
Mail : secretariat@prc.cnrs-gif.fr



A. Louis-Joseph



N. Morellet



F. Bontems



E. Guittet



J.-L. Leroy



E. Lescop



C. Sizun



C. Van Heijenoort

Nicolas Birlirakis, Alain Louis-Joseph et Nelly Morellet sont ingénieurs de recherche au CNRS, François Bontems (*auteur correspondant*), Éric Guittet, Jean-Louis Leroy, Ewen Lescop, Christina Sizun et Carine Van Heijenoort sont chercheurs au CNRS, au Laboratoire de chimie et biologie structurales et fonctionnelles de l'ICSN*.

* Laboratoire de chimie et biologie structurales et fonctionnelles, Institut de chimie des substances naturelles, UPR 2301 CNRS, F-91190 Gif-sur-Yvette. Courriel : francois.bontems@icsn.cnrs-gif.fr