# Polarisation dynamique nucléaire à haut champ magnétique et résonance paramagnétique électronique

Gaël De Paëpe et Serge Gambarelli

Résumé Cet article met en lumière deux méthodes de spectroscopie magnétique qui se sont fortement développées récemment. Elles ont en commun d'utiliser le moment magnétique associé au spin électronique qui est significativement plus grand que ceux associés aux spins nucléaires. Ainsi, à température et champ magnétique donnés, la polarisation des électrons est bien plus grande que celles des noyaux. Cette propriété est utilisée en polarisation dynamique nucléaire (DNP) pour augmenter de plusieurs ordres de grandeur la sensibilité de détection des spins nucléaires. Dans cet article est décrit notamment comment le développement récent de sources micro-ondes haute fréquence et haute puissance et de sondes DNP compatibles avec la rotation pneumatique de l'échantillon (« à l'angle magique ») ont permis d'étendre cette technique d'hyperpolarisation jusqu'aux champs magnétiques les plus intenses actuellement accessibles. Puis est montré comment l'utilisation d'un moment magnétique électronique important permet aussi de mesurer des distances longues dans des systèmes désordonnés par résonance paramagnétique électronique impulsionnelle, ce principe consistant à mesurer l'interaction dipolaire entre deux spins électroniques grâce à une séquence appelée DEER. Il est ainsi possible de mesurer des distances allant jusqu'à 80 Å dans des systèmes désordonnés. Les applications sont nombreuses en chimie et biologie. Mots-clés Polarisation dynamique nucléaire, RMN, résonance paramagnétique électronique, rotation à l'angle

magique, mesure de distance.

#### High field dynamic nuclear polarization and electron paramagnetic resonance Abstract

This article relates two recently developed magnetic spectroscopy methods. Both methods use the electron magnetic moment, which is significantly more intense than the more commonly used nuclear magnetic moment. This is because, at a given temperature and magnetic field, electrons are much more strongly polarised than nuclei. This property is used in dynamic nuclear polarisation (DNP) to increase the sensitivity of nuclear spin detection by several orders of magnitude. This article first describes how the recent development of high-frequency microwave sources and DNP probes compatible with pneumatic rotation of the sample ("magic angle spinning") have extended this hyperpolarisation technique to the most intense magnetic fields currently available (> 10 tesla). The second part shows how a strong electron magnetic moment allows to measure long distances in disordered systems by pulsed electron paramagnetic resonance. By measuring the dipolar interaction between two electron spins, using a sequence known as DEER, it becomes possible to measure distances up to 80 Å in disordered systems. This technique has many applications in chemistry and biology.

Keywords

Dynamic nuclear polarisation, NMR, electron paramagnetic resonance, magic-angle spinning, distance measurement.

et article présente les avancées récentes de deux sousdomaines de la résonance magnétique : la polarisation dynamique nucléaire (DNP) et la mesure de distance par résonance paramagnétique électronique (RPE). Ces deux domaines ont en commun d'utiliser les propriétés du spin de l'électron et des systèmes paramagnétiques pour réaliser des expériences performantes.

Ces techniques reposent sur l'utilisation du moment magnétique associé au spin électronique (rapport gyromagnétique) significativement plus grand que ceux associés aux spins nucléaires. Il est instructif à cet égard de comparer quelques grandeurs dans le cas d'un électron et d'un proton  $(\gamma_e = 660 \gamma_H)$ . L'énergie Zeeman (interaction entre un champ magnétique et un spin) qui est proportionnelle au rapport gyromagnétique est 660 fois plus grande pour un spin électronique que pour le spin du proton. En conséquence, la polarisation (différence de population à température finie entre les niveaux) sera, à température et champ magnétique statique donnés, plus importante en RPE qu'en RMN. C'est cet effet qui est utilisé en DNP pour augmenter la sensibilité d'une expérience de RMN.

L'interaction dipolaire entre deux spins électroniques dépend, quant à elle, du carré du rapport gyromagnétique. Toute chose égale par ailleurs, cette interaction sera donc  $(660)^2 = 436\ 000$  fois plus intense que pour deux protons. Elle pourra donc être mesurée à plus longue distance : c'est l'effet exploité dans la mesure des longues distances en RPE.

### La polarisation dynamique nucléaire (DNP)

Le phénomène de DNP est loin d'être nouveau puisqu'il fut mis en évidence au début des années 1950 à des champs magnétiques de l'ordre de 0,03 tesla (T) [1-3]. Malgré plusieurs décennies de développements méthodologiques visant à améliorer la description et la compréhension du

phénomène [4-6], la technique de DNP ne s'est cependant pas naturellement imposée comme un outil de choix pour le chimiste ou le biologiste. De multiples raisons l'expliquent : l'accès à des champs magnétiques de plus en plus intenses (5-23 T), le développement de la RMN impulsionnelle multidimensionnelle par transformée de Fourier, la réduction du bruit thermique de mesure, etc. ont permis de gagner plusieurs ordres de grandeur en sensibilité et d'accéder à une résolution suffisante pour accompagner de nombreux développements dans le domaine de la chimie et de la biologie. L'efficacité de la DNP est, quant à elle, approximativement inversement proportionnelle au champ magnétique appliqué et donc potentiellement inadaptée au champ magnétique intense. Son application à des champs magnétiques compatibles avec des expériences RMN haute résolution (i.e. > 5 T) était donc loin d'être évidente, et comme nous le verrons par la suite, a nécessité de nombreux développements conceptuels et instrumentaux [7-9].

#### Principes généraux

En 1953, Overhauser proposa pour la première fois de saturer les transitions de spins électroniques dans les métaux afin d'augmenter la polarisation des spins nucléaires [2]. Cette idée fut rapidement vérifiée par Carver and Slichter (1953) sur du lithium métallique dans un champ magnétique de 0,03 T [1]. L'augmentation de polarisation observée correspond à un transfert d'aimantation entre les spins électroniques et les spins nucléaires. Ces travaux constituent le fondement de la DNP. Ils furent rapidement étendus aux diélectriques solides par Abragam et coll., avec l'introduction de « l'effet solide » en 1959 [6]. Dans les années 1960, plusieurs groupes décrivirent le phénomène de DNP pour des systèmes constitués de deux spins électroniques couplés et un spin nucléaire (« cross effect »). Par la suite, Goldman et coll. étendirent la théorie de la DNP à des systèmes contenant plusieurs spins électroniques et nucléaires couplés en introduisant le concept de « température de spin ». Plus tard, dans les années 80,



Figure 1 - Diagramme montrant la polarisation électronique et nucléaire en fonction de la température pour différentes valeurs de champs magnétiques.

Pour des températures supérieures à 1 K, la polarisation est proportionnelle au champ magnétique appliqué, au rapport gyromagnétique du spin considéré ( $\gamma_e = 660 \gamma_H$ ), et inversement proportionnelle à la température. La polarisation nucléaire disponible pour réaliser une expérience RMN est typiquement de l'ordre de 10<sup>-5</sup> à température ambiante, même aux champs magnétiques les plus intenses couramment accessibles (*i.e.* 23 T). La polarisation électronique est quant à elle largement supérieure, typiquement de trois ordres de grandeur.

Wind, Yannoni, Schaeffer *et coll.* réalisèrent les premières expériences de DNP (à 1,4 T) en phase solide avec rotation de l'échantillon à l'angle magique, dans le but de minimiser les largeurs de raies à mi-hauteur. À la même période, la DNP en phase liquide (basée sur l'effet Overhauser) fut étudiée en détail pour un champ magnétique inférieur à 1 T. Le résultat principal est que l'efficacité de la DNP décroît quand la fréquence d'irradiation micro-onde est supérieure à l'inverse du temps de corrélation de rotation ou de translation.

L'utilisation de la DNP à des champs magnétiques plus intenses (compatibles avec les champs magnétiques couramment utilisés de nos jours) s'est révélée difficile en raison de l'absence de source micro-ondes capable de réaliser une irradiation *in situ* de l'échantillon à des fréquences supérieures à 100 GHz, ou de mécanismes DNP efficaces dans ce régime.

La première solution à ce problème, développée par Dorn *et coll.*, a consisté à polariser les échantillons à bas champ magnétique (< 1 T), puis à transférer l'échantillon à haut champ magnétique pour réaliser l'expérience RMN. Ce principe de DNP à champ variable a été optimisé au cours de la dernière décennie en minimisant les pertes pendant le transfert : des dispositifs de transfert de plus en plus efficaces ont été développés, ainsi que des aimants à deux centres pour minimiser le trajet à parcourir. La valeur du champ magnétique résiduel pendant le transfert est aussi mieux contrôlée. Plus généralement, ce type d'expérience DNP est désormais appelé « DNP par dissolution » puisque la plupart des implémentations consistent à polariser l'échantillon à ultra basse température, puis à enregistrer les données par RMN liquide à plus haut champ magnétique.

La deuxième approche, basée sur une irradiation *in situ* de l'échantillon à haut champ magnétique, a nécessité le développement de sources micro-ondes haute fréquence et haute puissance et de sondes DNP avec rotation pneumatique de l'échantillon (« à l'angle magique », MAS) capables d'assurer une température cryogénique (*i.e.* ~ 90-100 K) sur l'ensemble de l'échantillon mesuré [7-9].

#### La DNP à l'état solide in situ : la renaissance

#### Défis instrumentaux majeurs

Le développement de la DNP à haut champ magnétique a nécessité de relever plusieurs défis instrumentaux majeurs comme le développement de sources micro-ondes haute fréquence (~ 100-500 GHz) et haute puissance (1-50 W) et de sondes RMN capables de réaliser une irradiation in situ de l'échantillon aux fréquences de Larmor des électrons et des noyaux, tout en préservant la rotation pneumatique de l'échantillon à des fréquences de l'ordre de la dizaine de kHz. Le champ radiofréquence est généralement généré à l'aide d'une bobine solénoïde dont la géométrie est directement compatible avec la rotation pneumatique de l'échantillon (voir *figure 2*). Cependant, la bobine (1 à 5 mm de diamètre) et les paliers pour la rotation MAS ont jusqu'à présent limité la conception de cavité résonante pour les micro-ondes. Ceci contraste avec les cavités utilisées en RPE qui atteignent typiquement des facteurs Q de l'ordre de 1 000, alors qu'on considère qu'une sonde DNP sans cavité résonante a un facteur Q proche de l'unité. Sachant que le champ B<sub>1</sub> créé et la puissance de la source sont reliés par

 $B_{\rm I} \sim \sqrt{PQ}$ , il est alors facile de comprendre que si les spectromètres RPE peuvent fonctionner avec des sources micro-ondes basse puissance (de l'ordre d'une dizaine



Figure 2 - Schéma de principe d'une expérience de polarisation dynamique nucléaire à haut champ magnétique comprenant un aimant haute résolution, une source micro-ondes haute fréquence et haute puissance.

(a) Sonde RMN-DNP cryogénique : 1. tête de sonde ; 2. section du Dewar sous vide ; 3. capacités radiofréquences (RF) d'accord positionnées dans le bas de la sonde ; 4. guide d'onde corrugué provenant du gyrotron ; 5. mirroirs plans et concaves permettant de diriger les micro-ondes dans le guide d'onde vertical ; 6. lignes de transferts sous vide pour les voies de fluides cryogéniques (« bearing » et « drive »). (b) Tête de sonde pour rotors de 4 mm de diamètre : 1. ensemble stator ; 2. porte-échantillon (rotor) à l'intérieur de la bobine RF inclinée à l'angle magique ; 3. miroir en métal ; 4. le conducteur interne de la ligne à transmission est corrugué à l'intérieur et est utilisé comme guide d'onde ; 5. le conducteur extérieur de la ligne à transmission est en acier inoxydable pour l'isolation thermique mais est plaqué avec de l'argent et de l'or pour permettre une bonne conductivité thermique. D'après [8] avec permission.

de mW), les sondes DNP développées au Massachusetts Institute of Technology (MIT) – et désormais disponibles commercialement – nécessitent quant à elles le développement de sources micro-ondes haute puissance.

Avant l'utilisation des gyrotrons, il manquait une source haute puissance capable d'opérer entre 100 et 600 GHz, et c'est ce qui a limité le développement de la DNP aux champs magnétiques supérieurs à 5 T. Dans un gyrotron, un faisceau d'électrons est lancé d'une cathode annulaire et accéléré vers une anode en présence d'un champ magnétique intense. Le profil du champ magnétique est conçu pour comprimer le faisceau lors de son passage dans le tube à vide en direction de la cavité résonante qui convertit l'énergie cinétique transverse du mouvement hélicoïdal des électrons en micro-ondes. Les gyrotrons sont appropriés pour la polarisation dynamique nucléaire à haut champ magnétique puisque leur fonctionnement repose sur l'utilisation de structures millimétriques à onde rapide. Les gyrotrons emploient un résonateur qui peut avoir des dimensions bien plus importantes que la longueur d'onde concernée, permettant de produire une onde haute puissance sur une grande durée. Des gyrotrons capables de générer une irradiation continue à 140, 250 et 460 GHz ont été construits pour équiper des spectromètres DNP. Ces sources, aujourd'hui accessibles, permettent de réaliser des expériences de DNP *in situ* à haut champ magnétique. Dans les expériences de DNP, les micro-ondes sont introduites soit selon l'axe de rotation du rotor, soit selon un axe perpendiculaire (voir *figure 2*).

## Transfert d'aimantation par DNP et diffusion de spin nucléaire

Principe général : le but d'une expérience de DNP solide est d'hyperpolariser les spins nucléaires d'un système moléculaire afin de l'étudier grâce aux outils classiques de RMN du solide. Les expériences de DNP décrites ici reposent essentiellement sur un transfert d'aimantation entre les électrons non appariés introduits dans l'échantillon (*i.e.* agents polarisants) et les novaux voisins environnants (e.g. protons), le tout relayé par de la « diffusion de spin nucléaire » afin de polariser le système d'intérêt. L'efficacité DNP est d'autant plus grande que la répartition en agents polarisants est uniforme et correspond typiquement à une concentration de l'ordre de 10-30 mM. Puisque la plupart des expériences de DNP sont effectuées à températures cryogéniques, on utilise couramment des cryoprotectants (glycérol, etc.) afin d'éviter la formation de cristaux (H<sub>2</sub>O par exemple) et de favoriser l'obtention de solution gelée type « verre ».

Dans la plupart des études rapportées, on utilise une matrice composée de  $H_2O/D_2O$ , de glycérol, dopée à 10-20 mM avec agents polarisants type « TEMPO » (voir *figures 3* et 5*a* p. 115). En fonction du type d'agents polarisants utilisés et du type de noyaux à polariser par DNP, on doit ajuster la fréquence d'irradiation micro-onde par rapport à la fréquence de Larmor électronique au champ magnétique utilisé. On obtient des profils d'excitation DNP (définie comme le rapport du signal sur bruit avec et sans irradiation micro-onde) tel celui rapporté à la *figure 3a*, constitué d'une partie à gain DNP positif et d'une autre à gain DNP négatif. La *figure 3b* présente la dépendance du gain



Figure 3 - (a) Profil de gain DNP en fonction du champ magnétique appliqué pour une irradiation micro-onde constante à 263 GHz utilisant 15 mM d'agent polarisant TOTAPOL. Données enregistrées à l'INAC avec un équipement DNP Bruker (opérant à ~ 10 T) sur une solution gelée de <sup>13</sup>C-urée (2 M) dans une matrice DNP composée de H<sub>2</sub>O/D<sub>2</sub>O/d<sub>8</sub>-glycérol. (b) Dépendance du gain DNP et de l'efficacité DNP correspondante (comparée au gain maximum théorique) en fonction de la température de l'échantillon.

DNP en fonction de la température de l'échantillon. La plupart des expériences de DNP actuelles permettent d'atteindre une température de l'échantillon (en rotation à l'angle magique) entre 90 et 105 K et de réaliser des gains DNP compris entre 15 et 60 correspondant à seulement quelques pourcents du gain théoriquement accessible. Compte tenu de la très forte dépendance en température, l'accès à des températures largement inférieures à 100 K semble donc être une solution pertinente pour augmenter significativement l'efficacité de l'expérience. Ceci nécessite de relever de nombreux défis technologiques dont la maîtrise de la rotation à l'angle magique en utilisant de l'hélium prérefroidi comme gaz alimentant la turbine et assurant une régulation en température à l'échantillon. Des travaux dans cette direction sont en cours dans plusieurs laboratoires et notamment au CEA Grenoble.

#### Conception de nouveaux agents polarisants

L'une des avancées importantes du groupe du professeur Griffin au MIT pour la DNP solide à haut champ magnétique est que l'effet croisé (« cross effect »), obtenu à l'aide de biradicaux comme agents polarisants permet d'avoir un meilleur transfert de polarisation que l'effet solide ou le mélange thermique. L'efficacité des expériences de DNP basées sur l'effet croisé est inversement proportionnelle au champ magnétique appliqué, mais les gains DNP rapportés jusqu'à présent sont suffisamment importants pour permettre des expériences jusqu'alors impossibles à réaliser. Le design d'agents polarisants pour la DNP est actuellement un champ de recherche très actif, notamment dans le groupe du professeur Tordo à Marseille.

#### Applications

La polarisation dynamique nucléaire à l'état solide à haut champ magnétique développée par le groupe de Griffin a pu être appliquée efficacement sur un nombre grandissant de systèmes tels que des virus et lipides, des peptides amyloïdogéniques, de larges protéines membranaires, etc. [8] (*figure 4*).

Les multiples développements instrumentaux, méthodologiques et conceptuels réalisés au cours des deux dernières décennies au MIT ont entraîné un regain d'intérêt majeur pour l'utilisation de la DNP pour les études par RMN du solide en rotation à l'angle magique. De plus, l'introduction d'une expérience commerciale par le constructeur Bruker a permis à d'autres groupes de démontrer la pertinence de l'approche sur de nouveaux systèmes et notamment pour la caractérisation de surfaces [10-11].

La technique de la DNP, inventée dans les premières heures de la RMN et maintenant compatible avec les très hauts champs couramment accessibles, est en passe de révolutionner la RMN du solide.

#### La résonance paramagnétique électronique (RPE)

Le grand moment magnétique associé au spin électronique est aussi exploité en RPE. En particulier s'est développée depuis une dizaine d'années une méthode pour mesurer des grandes distances entre spins électroniques : il s'agit de la séquence DEER pour « double electron electron resonance ». Elle permet de mesurer de manière efficace et fiable des distances allant jusqu'à 80 Å. Le principe est simple, bien connu et utilisé régulièrement en RMN : il s'agit de mesurer l'interaction dipolaire à travers l'espace de deux



Figure 4 - Expériences de DNP sur des nanocristaux de [20 %  $U^{-13}$ C, <sup>15</sup>N-GNNQ]QNY dans une matrice composée de glycérol-d<sub>8</sub>/D<sub>2</sub>O/H<sub>2</sub>O (60/30/10) avec 10 mM de TOTAPOL.

(a) Illustration du caractère hétérogène d'un échantillon DNP constitué d'un peptide cristallin et de la matrice DNP, basée sur des données TEM de cristaux de GNNQQNY. Les flèches indiquent la diffusion de l'hyperpolarisation nucléaire depuis la matrice DNP vers les cristaux. (b) Courbe de polarisation DNP comparant les signaux <sup>13</sup>C des peptides et de la matrice DNP. Les intensités des signaux sont normalisées par rapport à l'équilibre sans irradiation micro-onde. (c) Expériences de corrélation 2D <sup>13</sup>C-<sup>13</sup>C DNP-DARR sur le même échantillon. Reproduit avec permission d'après Van der Wel et al., J. Am. Chem. Soc., **2006**, *128*, p. 10840.

spins électroniques. Cette interaction est à la fois simple à modéliser (elle découle naturellement des équations de Maxwell) et ne dépend essentiellement que de l'intensité des moments magnétiques impliqués et de leur disposition dans l'espace (distance, orientation relative).

Puisque le moment magnétique associé à l'électron est au moins de trois ordres de grandeur plus grand que ceux associés aux noyaux, cela signifie que l'interaction dipolaire électron-électron sera plus intense que celle impliquant des noyaux et donc visible « de plus loin ». Il est donc facile de comprendre pourquoi les mesures de distances longues sont beaucoup plus faciles en RPE qu'en RMN. Cette mesure à longue distance est très intéressante car elle permet d'obtenir et d'utiliser des contraintes géométriques entre des points éloignés d'un système complexe. Elle est donc idéalement complémentaire avec des expériences de RMN où les distances obtenues sont plutôt inférieures à 10 Å.

#### Spécificités : marquage de spin et basse température

L'une des propriétés fondamentales de l'interaction dipolaire est d'être moyennée par l'agitation des molécules en phase liquide. En conséquence, une expérience de DEER s'effectue à des températures cryogéniques (entre 4 et 77 K) pour réduire au maximum les mouvements moléculaires. Un avantage annexe est l'augmentation de sensibilité qui découle de ce refroidissement (loi de Curie).

Un problème majeur subsiste en pratique. Les systèmes où existent naturellement des spins électroniques non appariés sont très rares en chimie et en biologie. De plus, même s'ils sont présents, on peut désirer mesurer la distance entre deux points précis d'une molécule ou d'un système plus complexe dans lesquels des spins électroniques sont mal positionnés. C'est pourquoi on utilise en général la méthode du marquage de spins. Il s'agit de greffer de manière contrôlée une petite molécule paramagnétique (radical libre stable) dans des positions bien



Figure 5 - Quelques molécules paramagnétiques stables employées comme marqueurs de spins et leurs utilisations en biochimie.

Il s'agit essentiellement de nitroxydes basés sur des cycles à 6 (a) ou 5 (b) atomes. c) Exemple de marquage d'une protéine sur un résidu cystéine ; d) exemple de marquage d'une base de l'ADN (guanine).

précises. On utilise en général des nitroxydes car ils sont faciles à synthétiser, stables dans de nombreuses conditions chimiques et de très petite taille (*figure 5*). Au cours des années s'est développé tout un ensemble de molécules et de procédures permettant de marquer dans des conditions douces non seulement les grandes fonctions chimiques (alcools, cétones acides, amines...), mais aussi certains acides aminés et certaines bases nucléiques dans des systèmes biologiques (protéines, ADN, ARN) (*figure 5*) [12].

Par rapport à la RMN, le fait de devoir marquer une molécule avant de l'étudier est à la fois une limite et un avantage. En effet, même simple, le marquage est une étape qui peut être délicate et qui entraîne des manipulations chimiques sur des systèmes parfois très fragiles. D'un autre côté, le spectre d'interaction dipolaire en RPE est très simple puisqu'on observe exclusivement les sondes introduites en nombre limité et non pas l'ensemble des noyaux présents dans une molécule. Cela permet de pouvoir travailler dans des systèmes complexes où de nombreuses molécules sont en interaction en gardant une bonne résolution.

#### En pratique

Les premières réalisations d'une expérience de DEER à trois impulsions datent de plus de trente ans [13]. Elles ont montré tout l'intérêt de cette méthode mais également ses limites. À cause de problèmes expérimentaux, une partie du signal était impossible à acquérir, rendant l'analyse mathématique difficile. Ce n'est qu'en 1999 qu'est apparue la séquence de DEER à quatre impulsions (figure 6) [14]. Au prix d'une légère baisse de sensibilité, elle permet d'acquérir l'ensemble de l'évolution dipolaire sans temps mort et d'obtenir ainsi des distances de manière précise et fiable grâce à des traitements du signal performants (régularisation de Tikhonov en particulier). Cette méthode permet d'obtenir une distribution de distance à partir du signal avec seulement une contrainte de régularité (le résultat doit être lisse). C'est l'apparition de cette variante, et son implémentation sur des spectromètres commerciaux, qui a marqué le véritable développement de cette méthode [15].



Figure 6 - Principe de la séquence DEER à quatre impulsions. Elle est basée sur l'observation de la fréquence de résonance d'un spin « bleu » pendant la manipulation d'un spin « rouge ». La séquence étant réalisée à basse température et en phase solide, l'utilisation d'écho est nécessaire.

Une expérience simple permet de bien mettre en évidence la puissance d'une expérience de DEER à quatre impulsions (figure 7). Si on mesure un échantillon contenant une molécule simple bimarquée (ici un diacide), on observe après acquisition une distance de 19,2 Å. La même expérience peut se réaliser avec un autre diacide margué à chaîne carbonée plus longue et qui va donc donner une distance plus longue (ici 23,8 Å). Supposons maintenant que nous mélangions les deux molécules en proportions égales. Le traitement de l'expérience de DEER donnera alors une distribution de distance bimodale (en noir) où l'on retrouve les deux distances précédentes en proportions égales. En résumé, nous sommes capables de connaître non seulement la distance moyenne entre les spins électroniques dans un échantillon, mais aussi la courbe de distribution de cette distance de manière quantitative et fiable.



Figure 7 - Exemple d'expérience de DEER à quatre impulsions. Si une molécule flexible est marquée à ses extrémités par des sondes nitroxydes, on peut facilement mesurer la distance correspondante (19,2 et 23,8 Å pour deux diacides à chaînes de 9 et 14 atomes de carbone respectivement). Si on mélange maintenant les molécules, on retrouve bien une distribution de distance composée de deux pics.

#### Exemple de mesure de distance sur un système d'intérêt biologique : le changement de conformation d'un brin d'ADN induit par une lésion

Les lésions de l'ADN induisent de nombreuses modifications conformationelles qui peuvent être importantes pour le recrutement des systèmes de réparation dans la cellule. Une stratégie pour mesurer de manière efficace ces changements peut être développée grâce à des expériences de DEER. À cet effet, on peut marquer doublement avec des sondes nitroxydes un brin d'oligonucléotide en des positions spécifiques, puis introduire éventuellement une lésion à étudier. Il suffit alors de mesurer la distance entre les marqueurs de spins dans les deux états du système (ici non lésé et lésé) : tout changement de distance traduit un changement de conformation. Cette stratégie est classique lors de l'étude d'un système d'intérêt biologique par DEER. Elle doit être complétée par des études de modélisation moléculaire afin de traduire ces contraintes de distance en géométrie globale de la molécule. Par exemple, dans le cas où un site abasique est introduit dans l'ADN, on observe très nettement une diminution de la distance d'environ 3 Å (courbe rouge) par rapport au même système non lésé (courbe bleue). Après analyses par dynamique moléculaire, on peut attribuer ce changement de distance au fait que la base en position complémentaire se positionne en dehors de la double hélice. On obtient alors un « tassement » de l'ADN correspondant à l'épaisseur d'une paire de base, soit environ... 3 Å ! [21].

#### Applications et derniers développements

On peut concevoir que l'application de cette méthode à des systèmes chimiques et biochimiques n'est limitée que par l'imagination et la capacité à greffer des sondes radicalaires de manière efficace. De très nombreux systèmes ont ainsi été étudiés. Dans les objets d'intérêt biologique, c'est l'étude des conformations des protéines et des fragments d'ADN et d'ARN qui s'est le plus développée [12]. Mais des polymères, des micelles, des défauts dans les solides ont aussi été étudiés par cette méthode [16-17]. Actuellement, on assiste à l'étude de systèmes de plus en plus complexes où plusieurs molécules sont en interaction (protéines/lipides, protéines/ADN, canaux ioniques...) [18-19]. Des schémas de mesures faisant intervenir plus de deux marqueurs de spins se développent (triangulation, assemblée polymère). Enfin, les premières mesures de distance dans des cellules vivantes sont apparues très récemment, ce qui permet d'imaginer le développement de cette méthode dans des conditions « in vivo » [20] (voir encadré).

#### **Références**

- [1] Carver T.R., Slichter C.P., Phys. Rev., 1953, 92, p. 212.
- Overhauser A.W., Phys. Rev., 1953, 92, p. 411. [2]
- Carver T.P., Slichter C.P., Phys. Rev., 1956, 102, p. 975. [3]
- Slichter C.P., Principles of Magnetic Resonance, Springer-Verlag, 1978. [4]
- Abragam A., The Principles of Nuclear Magnetism, Oxford University [5] Press. 1961.
- Abragam A., Proctor W.G., C.R. Acad. Sci., 1959, 246, p. 2253. [6]
- Hall D.A., Maus D.C., Gerfen G.J., Inati, S.J., Becerra L.R., Dahlquist F.W., Griffin R.G., *Science*, **1997**, *276*, p. 930. [7]
- [8] Hu K.-N., Yu H.-H., Swager T.M., Griffin R.G., J. Am. Chem. Soc., 2004, 126, p. 10844
- Barnes A.B., De Paëpe G., van der Wel P.C.A., Hu K.N., Joo C.G., Bajaj [9] V.S., Mak-Jurkauskas M.L., Sirigiri J.R., Herzfeld J., Temkin R.J., Griffin R.G., Appl. Magn. Reson., 2008, 34, p. 237.



- [10] Lesage A., Lelli M., Gajan D., Caporini M.A., Vitzthum V., Mieville P., Alauzun J., Roussey A., Thieuleux C., Mehdi A., Bodenhausen G.,
- Copéret C., Emsley L., J. Am. Chem. Soc., 2010, 132, p. 15459.
  [11] Lafon O., Rosay M., Aussenac F., Lu X.Y., Trebosc J., Cristini O., Kinowski C., Touati N., Vezin H., Amoureux J.P., Angew. Chem. Int. Ed., 2011, 50, p. 8367.
- [12] Schiemann O., Prisner T.F., Quarterly Reviews of Biophysics, 2007, 40, p. 1.
- [13] Milov A.D., Salikhov K.M., Shirov M.D., Fizika Tverdogo Tela, 1981, 23, p 975
- [14] Pannier M., Veit S., Godt A., Jeschke G., Spiess H.W., J. Magn. Reson., **2000**, *142*, p. 331. [15] Jeschke G., *ChemPhysChem*, **2002**, 3, p. 927.
- [16] Bode B.E., Dastvan R., Prisner T.F., J. Magn. Reson., 2011, 211, p. 11. [17] Kurzbach D., Kattnig D.R., B.Z. Zhang, Schluter A.D., Hinderberger D.,
- J. Phys. Chem. Lett., 2011, 2, p. 1583. [18] Endeward B., Butterwick J.A., MacKinnon R., Prisner T.F., J. Am. Chem.
- Soc., 2009, 131, p. 15246. [19] Junk M.J.N., Spiess H.W., Hinderberger D., J. Magn. Reson., 2011, 210, p. 210.
- [20] Krstic I., Hansel R., Romainczyk O., Engels J.W., Dotsch V., Prisner T.F., Angew. Chem. Int. Ed., 2011, 50, p. 5070.
- [21] Sicoli G., Mathis G., Aci-Seche S., Saint-Pierre C., Boulard Y., Gasparutto D., Gambarelli S., Nucleic Acids Research, 2009, 37, p. 3165.



Gaël De Paëpe et Serge Gambarelli sont chercheurs à l'Institut Nanosciences et Cryogénie au CEA Grenoble\*, ils développent de où nouvelles applications des spectroscopies magnétiques (RMN, RPE, DNP).



G. De Paëpe

Laboratoire de Chimie Inorganique et Biologique, UMR-E3 CEA-Grenoble/DSM/INAC/SCIB/LRM, F-38054 (CEA/UJF), Grenoble.

Courriel : serge.gambarelli@cea.fr