



Etude des interactions supramoléculaires entre complexes de lanthanides et acides aminés : application en cristallographie des protéines

Sandrine Denis-Quanquin

► To cite this version:

Sandrine Denis-Quanquin. Etude des interactions supramoléculaires entre complexes de lanthanides et acides aminés : application en cristallographie des protéines. Chimie analytique. Université de Lyon, 2021. Français. NNT : 2021LYSEN066 . tel-03917515

HAL Id: tel-03917515

<https://theses.hal.science/tel-03917515>

Submitted on 2 Jan 2023

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

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



Numéro National de Thèse : 2021LYSEN066

THÈSE DE DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE LYON
opérée par
l'École Normale Supérieure de Lyon

École Doctorale N° 206
École Doctorale de Chimie (Chimie, Procédés, Environnement)

Discipline : Chimie

Soutenue publiquement le 02/12/2021 par :

Sandrine DENIS-QUANQUIN

**Étude des interactions supramoléculaires entre
complexes de lanthanides et acides aminés :
application en cristallographie des protéines.**

Devant le jury composé de :

BONNET, Célia	Chargée de Recherche	CBM, Orléans	Rapporteure
KIEFFER, Bruno	Professeur des Universités	Université de Strasbourg	Rapporteur
AROULANDA, Christie	Maîtresse de Conférences	Université de Paris Saclay	Examinatrice
LESAGE, Anne	Ingénieure de Recherche	CRMN, Lyon	Examinatrice
MAURY, Olivier	Directeur de Recherche	ENS de Lyon	Directeur
GIRAUD, Nicolas	Professeur des Universités	Université de Paris	Co-encadrant

REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier le CNRS, qui m'a autorisée à consacrer une partie de mon temps d'Ingénieure d'Études à la poursuite de ces travaux de recherches, me permettant d'enrichir à la fois mes connaissances et mes compétences techniques.

Ce manuscrit marque la fin d'une thèse un peu plus longue que les 3 années habituelles de la plupart des étudiants du Laboratoire De Chimie (LCH). J'adresse donc toute ma gratitude à Chantal Andraud, directrice du LCH au début de ma thèse, pour sa bienveillance, et pour m'avoir toujours fait confiance et permis d'aménager mon temps de travail. Je remercie aussi Stéphane Parola, directeur actuel du LCH, pour sa disponibilité et sa confiance, malgré des conditions de travail parfois compliquées depuis 2020.

Je tiens à remercier le Dr. Célia Bonnet et le Pr. Bruno Kieffer d'avoir accepté d'être les rapporteur.e.s de ce manuscrit et de l'intérêt qu'ils ont porté à mon travail. Merci également au Dr. Christie Aroulanda et au Dr. Anne Lesage d'avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse.

Je remercie aussi le Dr. Marc André Delsuc, à l'IGBMC, pour son aide précieuse avec la mise en place et l'optimisation des expériences de diffusion ainsi que pour ses conseils concernant l'estimation de la précision de nos mesures.

Merci à Roland Montserret, à l'IBCP, pour nous avoir fourni le peptide SASY qui nous a permis de tester notre méthode sur un système biologique intéressant.

Je remercie toutes les personnes ayant collaboré sur les divers projets de cette thèse, qu'il s'agisse de collègues actuels ou passés ou de collaborateurs extérieurs au laboratoire. Merci d'abord à François Riobé, qui a toujours été là pour répondre à mes questions (parfois naïves) de non-chimiste. Merci à Sébastiano Di Pedro pour son expertise en RMN paramagnétique. Merci à Elise Dumont, Alessio Bartocci et Florence Szczepaniak pour les nombreux calculs de Dynamique Moléculaire nécessaires à l'étude des systèmes impliquant les complexes de dipicolinates. Merci aussi à Fabrice Pointillart et Boris Le Guennic qui nous ont sollicités pour l'étude RMN du système paramagnétique présenté au chapitre VI.

Je remercie bien sûr mes encadrants Olivier Maury et Nicolas Giraud qui ont accepté de gérer une thésarde à mi-temps, et même parfois en mi-temps thérapeutique... Un immense merci pour votre bienveillance et votre patience pendant ces quelques années compliquées pour moi. Merci de m'avoir écoutée quand ça n'allait pas et encouragée quand ça allait bien, je n'aurais pas pu rêver meilleur encadrement ! Merci à François que j'ai souvent sollicité avec des questions naïves de non-chimiste.

Merci à mes collègues en or du labo de synthèse le plus sympa du LCH: Laure, Delphine et JC. Laure Lise est partie à Cachan mais son rire résonne encore sous les sorbonnes ! Merci

d'être vous, d'être là, je ne vais pas rentrer dans les détails sinon ça prendrait des pages mais la vie au labo serait clairement moins agréable sans vous ! Merci aussi à Damien, Christian et Yann qui se joignent à nous pour les pauses café et les blagues à 2 balles.

Merci à mes voisins de bureau Fred & Fred qui sont toujours dispos quand j'ai besoin d'un coup de main, d'un outil ou de rire un peu.

Merci aux collègues partis bosser ailleurs (et c'est bien dommage !) pour leur amitié et les fous rires autour d'un mojito ou d'un verre de vin blanc, Kevin, Anne Gaelle, Adrien, Quentin, Wissam, Monica, Maelle, Sara, Aline, Bastien, Martin, Guillaume, Simon, Jeremy, Ahn Ti, Benjamin... et j'en oublie sûrement plein d'autres!

Je remercie mes confrères et consœurs RMNistes pour tous leurs conseils techniques, Chantal, Anne, Caro, Nicolas, Marie Aude, Fernande, Karine...

Je ne remercie pas l'air comprimé de l'ENS, qui a compromis tant de manips au fil des années !

Merci à ma mère et ma fille pour leur soutien inébranlable et leur amour, et le meilleur pour la fin, merci à l'amour de ma vie, Simon, qui me supporte au quotidien et m'a aimé alors que je n'avais encore qu'un diplôme de master ;) Ce manuscrit est un peu pour toi mon amour.

RÉSUMÉ EN FRANÇAIS

Ces travaux de thèse présentent les différentes approches que j'ai explorées dans le but de développer une méthode d'étude du mode d'interaction en solution entre un complexe de lanthanide de type tris-dipicolinate $[\text{Ln}(\text{DPA})_3]^{3-}$ et des protéines. La principale méthode développée avec succès est basée sur la mesure de diffusion par RMN de ces systèmes, qui mettent en jeu des lanthanides paramagnétiques. Après une étape d'optimisation sur un système simple diamagnétique, l'influence du paramagnétisme a été évaluée. Il apparaît qu'un temps de relaxation T_1 raccourci n'empêche pas systématiquement la mesure d'un coefficient de diffusion, et qu'il est donc possible de combiner les atouts de la RMN paramagnétique et ceux des mesures de diffusion pour caractériser finement l'interaction supramoléculaire impliquant un système paramagnétique.

La méthode de mesure de diffusion montre ainsi son intérêt comme première étape d'une étude complète par RMN et Modélisation Moléculaire de systèmes biologiques. Cette méthode permet de caractériser une interaction supramoléculaire entre un complexe de lanthanide paramagnétique et différents partenaires en solution (petite molécule, peptide intrinsèquement désordonné ou protéine). Elle est applicable même dans le cas d'une interaction faible ou d'un système très dynamique. En outre le potentiel analytique du paramagnétisme du complexe peut être exploité, et les expériences de RMN paramagnétique apportent ainsi des informations supplémentaires sur le détail de l'interaction. Le complexe $[\text{Ln}(\text{DPA})_3]^{3-}$, qui est utilisé pour la détermination de structures cristallines, permet ainsi de comparer les structures d'un système protéine/complexe à l'état solide (cristal) et en solution.

La méthodologie RMN décrite dans cette thèse a été ensuite utilisée pour caractériser divers systèmes supramoléculaires au laboratoire. Une étude combinant mesure de diffusion, RMN paramagnétique et Modélisation Moléculaire illustre l'intérêt de cette méthode pour un système impliquant encore une fois un complexe de lanthanide paramagnétique.

RÉSUMÉ EN ANGLAIS

This PhD work presents the different approaches I have explored in order to develop a method to study in solution the interaction mode between a tris-dipicolinate lanthanide complex $[\text{Ln}(\text{DPA})_3]^{3-}$ and proteins. The main method successfully developed is based on NMR diffusion measurements of these systems with the use of paramagnetic lanthanides. After an optimization step on a simple diamagnetic system, the influence of the paramagnetism was evaluated. It appeared that a shortened relaxation time T_1 did not systematically prevent the measurement of a diffusion coefficient, and that it was thus possible to combine the advantages of paramagnetic NMR and diffusion measurements to finely characterize a supramolecular interaction involving a paramagnetic system.

The diffusion measurement method seems interesting as the first step of a complete NMR and Molecular Modeling study of biological systems. This method allows to characterize a supramolecular interaction between a paramagnetic lanthanide complex and its different partners in solution (small molecule, intrinsically disordered peptide or protein). It is applicable even in the case of a weak interaction or a very dynamic system. Furthermore, the analytical potential of the paramagnetism of the complex can be exploited, and paramagnetic NMR experiments provide additional information on the details of the interaction. The $[\text{Ln}(\text{DPA})_3]^{3-}$ complex, which is used for crystal structure determination, thus allows comparison of the structures of a protein/complex system in the solid state (crystal) and in solution.

The NMR method developed in this work was then successfully used to characterize various supramolecular systems in the laboratory. A study combining diffusion measurements, paramagnetic NMR and Molecular Modeling illustrates the interest of this method with a system involving once again a paramagnetic lanthanide complex.

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ADN	Acide DésoxyriboNucléique
AMBER	Assisted Model Building and Energy Refinement
ATP	Adénosine TriPhosphate
BPPLIED	Bipolar Pulse Pairs Longitudinal Eddy current Delay
CD	Circular Dichroism (Dichroisme Circulaire)
COSY	COrrrelation SpectroscopY
CPMG	Carr-Purcell-Meiboom-Gill
DFT	Density Functional Theory (Théorie de la Fonctionnelle de Densité)
DLS	(Dynamic Light scattering) Diffusion Dynamique de la Lumière
DOSY	Diffusion Ordered SpectroscopY
DPA	Dipicolic acid
DRX	Diffraction aux Rayons X
FCS	Fermi Contact Shift
HEWL	Hen Egg White Lysozyme
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Coherence
IDP	Intrinsically Disordered Protein
ITC	Isothermal Titration Calorimetry
MD	Molecular Dynamics (Dynamique Moléculaire)
MM	Mécanique Moléculaire
MQ	Mécanique Quantique
nOe	nuclear Overhauser effect
PBS	Phosphate Buffered Saline (Tampon Phosphate Salin)

PCS	Pseudo Contact Shift
PDB	Protein Data Bank
PFG	Pulse Field Gradient
PGSE	Pulse Gradient Spin Echo
PRE	Paramagnetic Relaxation Enhancement
RMN	Résonance Magnétique Nucléaire
ROESY	Rotating frame Overhauser Effect Spectroscopy
RX	Rayons X
SAR	Structure-Activity Relationship
S/B	rapport Signal/Bruit
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
STD	Saturation Transfer Difference
TOCSY	Total Correlation Spectroscopy
TROSY	Transverse Relaxation Optimized Spectroscopy

TABLE DES MATIÈRES

I - INTRODUCTION.....	15
1 - Liaisons chimiques.....	15
2 - Systèmes biologiques et interactions.....	16
2.1 Auto-assemblage de protéines.....	16
2.2 Drug discovery et drug design	17
2.3 Cristallisation de protéines	18
2.4 Chimie supramoléculaire	19
3 - Caractérisation d'une interaction par RMN	21
3.1 Analyse structurale des partenaires.....	21
3.1.1 COSY/TOCSY connectivité	21
3.1.2 ¹³ C et HSQC/HMBC	22
3.2 Dynamique d'une interaction.....	24
3.2.1 Cinétique.....	25
3.2.2 Thermodynamique.....	26
3.2.3 Interférences entre processus dynamiques et expérience RMN	27
3.2.4 Influence de K _d sur le spectre RMN d'un système en interaction.....	29
3.2.5 Stoechiométrie	30
4 - Méthodes RMN spécifiques aux systèmes protéine/ligand	31
4.1 Méthodes RMN basées sur l'observation du ligand	32
4.2 Méthodes RMN basées sur l'observation de la protéine.....	33
5 - Complexes de lanthanide pour la cristallisation de protéines	35
5.1 Un bon agent de cristallisation.....	35
5.2 Propriétés paramagnétiques.....	36
5.3 Étude d'un système modèle impliquant une petite molécule	36
6 - Étude par RMN de l'interaction entre un complexe de lanthanide et une protéine.....	38
6.1 RMN paramagnétique.....	38
6.1.1 PCS.....	39
6.1.2 PRE	40
6.2 Mesure de diffusion par RMN.....	42
6.3 Mesure de diffusion et paramagnétisme.....	43
6.4 Modélisation moléculaire.....	44
6.5 Systèmes impliquant un complexe de lanthanide paramagnétique	45
II - MÉTHODOLOGIE.....	47
1 - Mesure et précision.....	47
1.1 Mesure de diffusion par rmn : choix de la séquence.....	47

1.2	Expériences préliminaires.....	48
1.3	Précision de la mesure.....	51
1.4	Robustesse de la mesure	54
2 -	Influence du paramagnétisme	58
2.1	Précision de la mesure avec un système paramagnétique	58
2.2	Étude d'un complexe de terbium fortement paramagnétique.....	60
2.3	Test d'une série de lanthanides paramagnétiques	63
3 -	Étude d'un système dynamique	64
4 -	Conclusion	67
III -	<i>INTERACTION AVEC UNE PROTÉINE MODÈLE.....</i>	69
1 -	Choix du complexe de lanthanide	69
2 -	Hewl	70
3 -	Ubiquitine	71
3.1	Résultats précédents	71
3.2	Mesure de diffusion par RMN.....	72
3.3	RMN paramagnétique et Dynamique Moléculaire	75
4 -	Conclusion	77
IV -	<i>INTERACTION AVEC UN DÉCAPEPTIDE.....</i>	79
1 -	Choix d'un peptide et étude préliminaire	79
2 -	Mesures de diffusion.....	80
2.1	Titration et incertitude	80
2.2	Résultats de la titration : détermination de K_d	82
2.2.1	Diffusion du peptide.....	82
2.2.2	Diffusion du complexe de Praseodyme.....	83
3 -	RMN paramagnétique	84
3.1	PCS (Pseudo Contact Shifts).....	84
3.1.1	Détermination de K_d	85
3.1.2	Étude des PCS.....	86
3.2	PRE (Paramagnetic Relaxation Enhancement)	87
4 -	Modélisation moléculaire.....	90
5 -	Conclusion	94
V -	<i>CONCLUSION INTERMÉDIAIRE</i>	95
VI -	<i>APPLICATION À UN SYSTÈME PARAMAGNÉTIQUE.....</i>	97
1 -	Problématique : comparaison d'un système à l'état solide et en solution ..	97

2 - Mesure de diffusion	98
3 - RMN paramagnétique	101
3.1 Attribution des spectres ^1H	101
3.2 Modélisation moléculaire.....	105
4 - Conclusion	106
VII - CONCLUSION GÉNÉRALE - PERSPECTIVES	107
VIII - MATÉRIEL ET MÉTHODES.....	109
1 - Préparation des échantillons	109
1.1 Synthèse des complexes de lanthanides	109
1.2 Référence interne	109
1.3 Tampon.....	109
2 - Expériences RMN	110
2.1 Chapitre II : Méthodologie	110
2.1.1 Mesure de diffusion	110
2.1.2 Mesure de relaxation T_1	111
2.2 Chapitre III : Interaction avec une protéine modèle.....	111
2.2.1 Mesure de diffusion	111
2.2.2 TOCSY	111
2.2.3 HSQC ^{15}N	112
2.3 Chapitre IV : Interaction avec un décapeptide.....	112
2.3.1 TOCSY	112
2.3.2 ROESY	112
2.3.3 HSQC ^{13}C	113
2.3.4 Mesure de diffusion	113
2.4 Chapitre VI : Application à un système paramagnétique	113
2.4.1 Mesure de diffusion	113
2.4.2 Mesure de relaxation T_1	114
2.4.3 COSY	114
2.4.4 HSQC ^{13}C	114
IX - RÉFÉRENCES.....	115
X - ANNEXES.....	125

I - INTRODUCTION

La complexité du vivant est régie principalement par des interactions d'origine chimique à l'échelle moléculaire. Ainsi, la cohésion des membranes cellulaires dépend des interactions entre les lipides qui les composent ;¹ la structure en double hélice de l'ADN est due aux interactions entre nucléotides ;² nos enzymes reconnaissent et transforment des substrats pour produire de l'énergie ;³ nos neurotransmetteurs activent leurs récepteurs pour faire circuler des informations⁴... Tous ces phénomènes mettent en jeu des liaisons essentiellement non-covalentes entre des biomolécules et leurs ligands, et l'un des enjeux de la science moderne est d'identifier et de quantifier ces interactions que l'on qualifie souvent de supramoléculaires.

De nombreuses techniques biophysiques permettent de caractériser ce type d'interactions parmi lesquelles on peut citer la DLS (diffusion dynamique de la lumière) qui permet de mesurer le coefficient de diffusion de molécules en solution,⁵ l'ITC (titration calorimétrique isotherme) qui peut déterminer la constante d'association et la stœchiométrie d'une réaction,⁶ les spectroscopies optiques (absorption et émission)⁷ ou chiroptiques (dichroïsme circulaire ou CD),⁸ ou encore la RMN. Chaque technique a bien-sûr ses avantages et ses inconvénients et le choix est en général guidé par les contraintes expérimentales (type de système, quantité d'échantillon disponible, instrument à disposition, informations attendues...). Dans de nombreux cas la RMN offre un bon compromis : bien que moins sensible que d'autres techniques (ITC par exemple), la RMN ne donne pas seulement une information globale sur le système (enthalpie, taille ou affinité) mais permet d'obtenir des informations structurales avec une résolution de l'ordre de l'atome.^{9, 10} Elle est non invasive et permet d'observer des systèmes dynamiques en solution, voire même *in cellulo*.¹¹ Elle est applicable à l'observation d'une grande variété de systèmes biologiques impliquant des protéines ou des sucres, mais aussi à l'étude d'assemblage supramoléculaires mettant en jeu des molécules de synthèse.

1 - LIAISONS CHIMIQUES

Les liaisons chimiques sont en général classées en deux catégories selon qu'elles sont covalentes ou non-covalentes. Les liaisons covalentes sont des liaisons fortes basées sur le recouvrement de deux orbitales atomiques ayant chacune un électron libre, et l'énergie requise pour briser cette liaison est de l'ordre de plusieurs centaines de kJ.mol⁻¹.¹²

Les liaisons non covalentes sont quant à elle de plusieurs types (i) liaisons de coordination (ii) liaisons hydrogène (iii) interactions électrostatiques (iv) interactions hydrophobes. Les énergies associées avec ces liaisons sont plutôt faibles (jusqu'à quelques dizaines de kJ.mol⁻¹) et représentent des liaisons intra- ou inter-moléculaires. Ces interactions bien que dites

« faibles » peuvent modifier la conformation d'une biomolécule, elles sont ainsi responsables du repliement et de la dynamique des protéines, et sont impliquées dans les assemblages supramoléculaires. Elles entrent ainsi en jeu dans de nombreux systèmes biologiques.

2 - SYSTÈMES BIOLOGIQUES ET INTERACTIONS

De nombreux phénomènes chimiques et biologiques sont basés sur des interactions en solution impliquant plusieurs partenaires, qu'il s'agisse d'ions, de petites molécules ou de plus grosses entités (polymères, nanoparticules, protéines...). La complexité et l'intérêt scientifique de ces interactions sont très variés selon le système observé. Certaines interactions sont des phénomènes naturels d'intérêt biologique, voire médical, tandis que d'autres interactions sont utilisées pour la synthèse d'un objet d'intérêt chimique ou biologique, par exemple un médicament, un cristal de protéine ou une machine moléculaire. Les quelques exemples décrits ci-dessous illustrent ce propos sans prétendre être exhaustifs.

2.1 AUTO-ASSEMBLAGE DE PROTÉINES

Des phénomènes d'agrégation de protéines ou de peptides sont à l'origine de plusieurs maladies touchant des millions de personnes : maladie de Parkinson, diabète de type 2 et maladie d'Alzheimer.¹³ Dans le cas de la maladie d'Alzheimer des peptides β -amyloïdes, d'une taille d'environ 40 acides aminés, s'agrègent en plaques amyloïdes et en fibrilles qui s'avèrent neurotoxiques. Dans les années 1990 a été avancée l'hypothèse d'une cascade amyloïde pour expliquer la production et l'agrégation de peptides β -amyloïdes observée, et qui est associée au développement de la maladie d'Alzheimer. D'autres phénomènes, comme des pathologies associées à la protéine tau, semblent découler de cette cascade amyloïde. De nombreuses structures de peptides β -amyloïdes, sous forme de monomères, d'oligomères ou de fibrilles, ont déjà été résolues par RMN ou diffraction des RX.¹⁴ Les mécanismes de l'agrégation font aussi l'objet de nombreuses études, avec l'objectif d'inhiber ce phénomène à des fins thérapeutiques. Certaines équipes utilisent la RMN pour étudier notamment l'agrégation en solution¹⁵ et ses aspects dynamiques^{16, 17} (figure 1). Les modèles les plus probables de la formation des fibrilles amyloïdes considèrent une agrégation en plusieurs étapes. Lors de la phase de nucléation les peptides β -amyloïdes, en équilibre dynamique entre diverses formes plus ou moins repliées, s'auto-assemblent. Quand l'oligomère atteint une taille critique des fibrilles amyloïdes se forment, c'est la phase d'élongation.

La compréhension de ce mécanisme biologique est essentielle pour développer de nouveaux traitements : une stratégie consiste à mettre au point des ligands de peptides β -amyloïdes capables de prévenir ou du moins de perturber l'agrégation. Cette stratégie nécessite de trouver un ligand et d'étudier l'interaction pour optimiser l'effet inhibiteur.

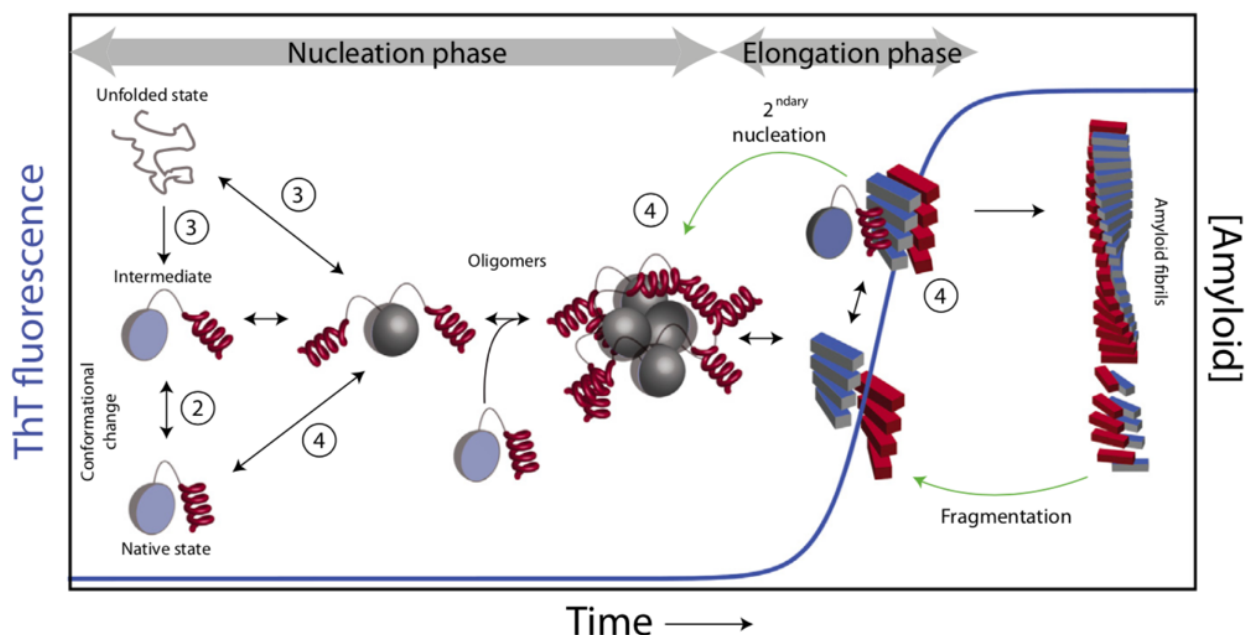


Figure 1 : mécanismes possibles de l'agrégation de peptides β -amyloïdes. Les différentes étapes de la formation des plaques amyloïdes sont basées sur des interactions dynamiques : échange conformationnel du précurseur monomérique, équilibres dynamiques monomère-oligomères, échange conformationnel entre noyau critique et feuillet β , interactions dynamiques entre feuillets β ... L'agrégation est suivie par fluorescence : la thioflavine T (ThT) est un fluorophore qui se lie aux feuillets β -amyloïdes. Figure issue de ¹⁵.

2.2 DRUG DISCOVERY ET DRUG DESIGN

Dans le domaine pharmaceutique la majorité des médicaments agissent sur des cibles protéiques, celles-ci pouvant être des enzymes, des canaux ioniques ou d'autres protéines importantes pour le fonctionnement de l'organisme traité. La conception de nouvelles substances pharmacologiquement actives passe souvent par des stratégies de criblage (virtuel¹⁸ ou expérimental⁹) ou par l'amélioration de molécules déjà connues pour interagir avec une protéine d'intérêt biologique.^{9, 19} Ce dernier processus est appelée « drug design », et se base sur l'étude de l'interaction entre une protéine d'intérêt et un ligand connu, dont l'affinité peut être très variable.²⁰ Cette interaction sert de point de départ pour la conception de meilleurs ligands, par modélisation moléculaire ou par modification chimique du ligand initial.

Une stratégie appelée SAR (SAR pour Structure-Activity Relationship) par RMN consiste par exemple à élaborer un ligand de haute affinité pour une protéine à partir de 2 ligands de faible affinité.²¹ Ce protocole peut être décomposé en plusieurs étapes (figure 2).

- 1- Une banque de petites molécules est criblée jusqu'à trouver un ligand de la protéine d'intérêt (P).
- 2- Puis des analogues sont testés à leur tour fin d'optimiser ce premier ligand.

- 3- Un second criblage a lieu en présence du premier ligand L_1 , afin d'identifier un second ligand.
- 4- Le second ligand est à son tour optimisé (L_2).
- 5- La localisation des 2 ligands dans le complexe $P-L_1-L_2$ est déterminée expérimentalement et si les sites de liaison de L_1 et L_2 sont proches un « superligand » hybride L_1-L_2 est synthétisé, avec une forte affinité pour la protéine.

La dernière étape nécessite une étude structurale de la protéine pour localiser les sites d'interactions. Bien que la structure 3D des protéines puisse être déterminée par RMN, ce n'est pas la technique la plus utilisée et la diffraction des rayons X lui est souvent préférée.

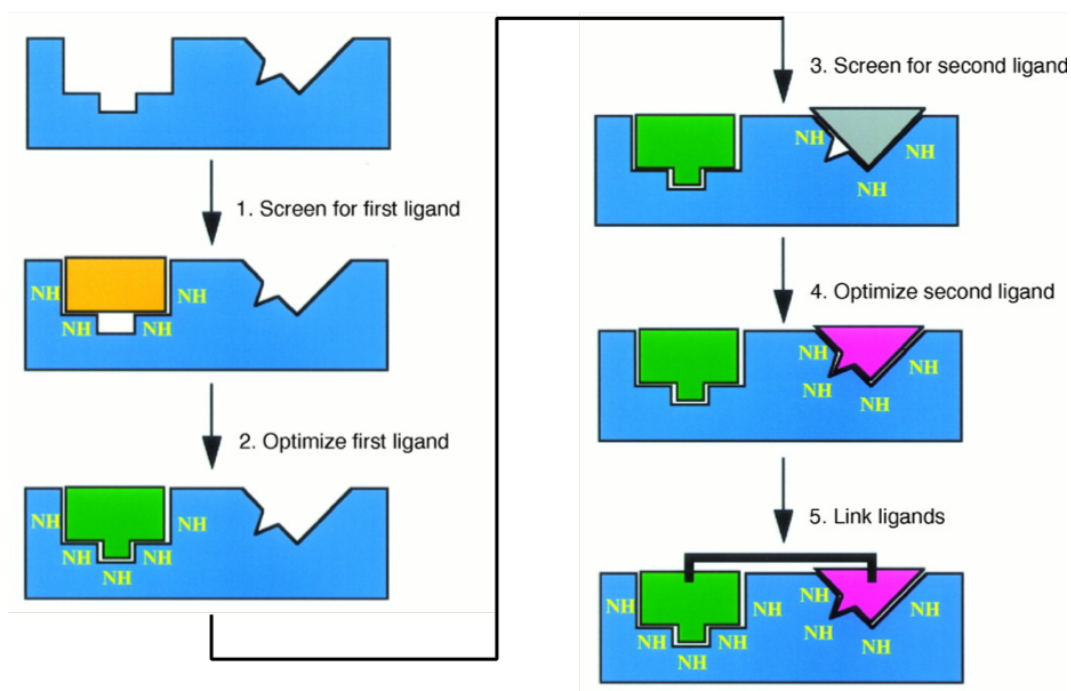


Figure 2 : représentation du protocole SAR en 5 étapes. Figure issue de ²¹.

2.3 CRISTALLISATION DE PROTÉINES

De nos jours la diffraction aux rayons X est toujours la technique principale pour résoudre la structure tridimensionnelle des protéines.^{22, 23} En 2020, 80% des 14046 nouvelles structures déposées à la Protein Data Bank (PDB <https://www.rcsb.org>) ont été résolues par diffraction des RX (DRX). Cependant, malgré de nombreux progrès technologiques obtenus depuis les premières structures résolues (production de protéines recombinantes, techniques de purification, cristallisation robotisée à haut débit, faisceaux synchrotrons toujours plus intenses...), l'étape d'obtention d'un cristal reste souvent l'étape limitante.²⁴ Les kits de cristallisation disponibles sur le marché permettent de cribler des centaines de conditions pour chaque protéine de manière automatique sur des plateformes à haut débit dédiées. Certaines molécules ajoutées au milieu de cristallisation peuvent initier la nucléation ou aider

la croissance du cristal, on parle d'agent de cristallisation. Ces agents jouent le rôle de « glue moléculaire » favorisant les contacts cristallins entre protéines. De nos jours trois grandes familles sont utilisées : les calixarènes anioniques,²⁵ les polyoxometallates (clusters de métaux de transition)²⁶ et certains complexes de lanthanide dont l'effet d'atome lourd participe en plus à la résolution de la structure.²⁷ Il faut remarquer que l'ajout d'un agent de cristallisation peut induire la cristallisation, modifier la maille cristalline et/ou permettre d'atteindre une meilleure résolution (figure 3).^{27, 28}

Les complexes de lanthanides étudiés dans notre équipe depuis une quinzaine d'années peuvent non seulement jouer le rôle d'agent de cristallisation mais aussi celui d'agent de phasage grâce à leurs propriétés de diffusion anormale dues à la présence d'un atome lourd (le lanthanide).

L'interaction agent de cristallisation/protéine intéresse donc particulièrement les cristallographes pour qui une bonne compréhension de ce mécanisme pourrait permettre de prédire quelle molécule utiliser selon la protéine à cristalliser.

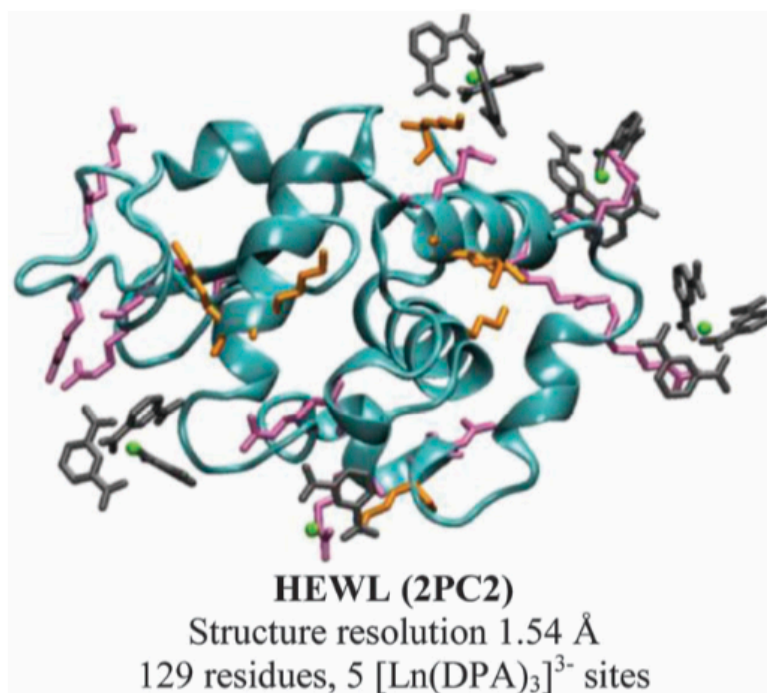


Figure 3 : structure du lysozyme de blanc d'œuf de poule (HEWL) co-cristallisé avec 5 complexes de lanthanide [Ln(DPA)₃]³⁻. Figure issue de ²⁹.

2.4 CHIMIE SUPRAMOLÉCULAIRE

La chimie supramoléculaire s'inspire de l'observation de systèmes biologiques, on y observe donc les mêmes phénomènes d'interactions. Le terme supramoléculaire est introduit par J.-M. Lehn et définit des assemblages de molécules basés sur des interactions non-covalentes.³⁰

De tels systèmes trouvent des applications pratiques dans des domaines variés : chimie des matériaux, catalyse, machines moléculaires, médecine.

Dans le domaine biomédical par exemple, de multiples applications sont basées sur des systèmes de type « hôte-invité » (figure 4).³¹ L'inclusion de molécules thérapeutiques ou de gènes dans des cages moléculaires, des vésicules ou des micelles permet une administration ciblée, vers des cellules cancéreuses par exemple. Des nanoparticules ou des hydrogels ont aussi montré des propriétés très intéressantes pour la délivrance de médicaments. Des systèmes supramoléculaires sont aussi utilisés pour améliorer la stabilité ou la fluorescence de marqueurs biologiques. La compréhension des interactions supramoléculaires en jeu est indispensable pour améliorer les systèmes utilisés et pour développer de nouvelles applications.

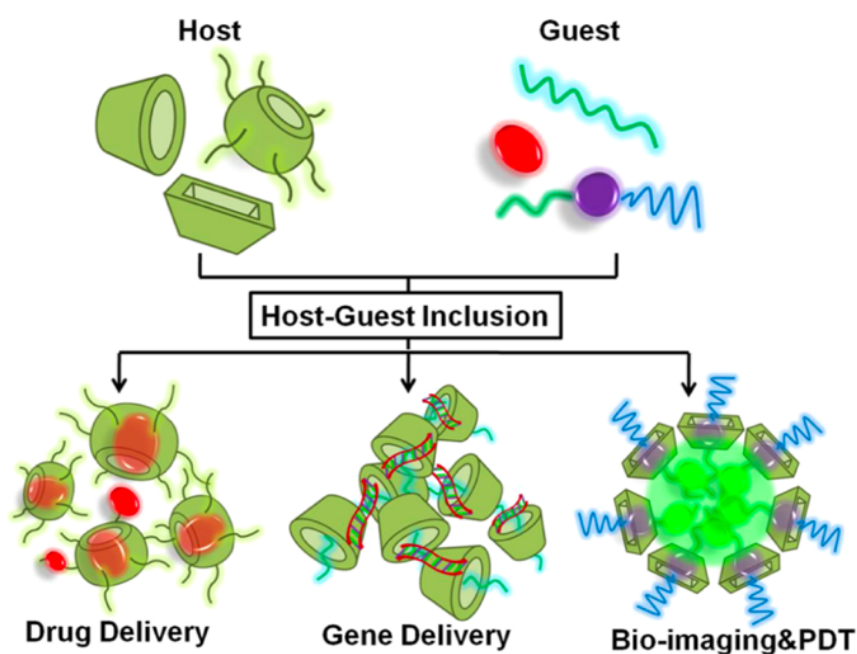


Figure 4 : exemples d'applications biomédicales de systèmes supramoléculaires basés sur une interaction hôte-invité. Figure issue de ³¹. L'encapsulation peut permettre la délivrance (i) de substances actives vers une cible spécifique (ii) de matériel génétique thérapeutique (iii) de marqueurs utilisés pour de l'imagerie médicale ou de la thérapie photodynamique (PDT).

Les exemples présentés illustrent la variété des systèmes capables de développer des interactions supramoléculaires présentant un intérêt scientifique. Les techniques de caractérisation à disposition du chimiste sont tout aussi diverses, cependant la RMN est peut-être la plus polyvalente: elle est particulièrement adaptée à l'étude des interactions non-covalentes, même si celles-ci sont faibles, et permet de recueillir une variété d'informations -structurale, thermodynamique, cinétique- nécessaires à la bonne compréhension du système.

3 - CARACTÉRISATION D'UNE INTERACTION PAR RMN

3.1 ANALYSE STRUCTURALE DES PARTENAIRES

Quand deux molécules mises en présence interagissent, on observe en général des modifications à la fois de leur structure et de leur dynamique. Il est donc important de caractériser tout d'abord les partenaires du système à l'état libre pour détecter ces changements qui sont souvent de l'ordre de la perturbation des systèmes initiaux. En effet, quelle que soit la nature des interactions mises en jeu (liaisons hydrogènes, interactions hydrophobes, Pi-stacking, interactions ioniques...), le système ne se comporte pas comme la simple juxtaposition des espèces libres. La comparaison des caractéristiques des espèces libres et liées est à la base de l'étude des interactions moléculaires.

La RMN est aujourd'hui une technique d'analyse idéale pour l'analyse structurale de mélanges en solution, et de nombreuses expériences en 1 et 2 dimensions sont utilisables en routine sur les spectromètres RMN modernes.^{32, 33} Les noyaux les plus communément observés en chimie organique sont le proton ^1H et le carbone ^{13}C , et les expériences les plus utilisées sont référencées dans de nombreuses revues plus ou moins exhaustives.³⁴⁻³⁷ Les macromolécules comme les protéines ou les acides nucléiques, du fait de leur complexité, nécessitent souvent des stratégies spécifiques qui ne seront pas détaillées ici. Les expériences présentées ci-dessous se limitent à celles utilisées dans ces travaux de thèse.

3.1.1 COSY/TOCSY connectivité

Les expériences COSY (COrrrelation SpectroscopY)^{38, 39} et TOCSY (Total Correlation SpectroscopY)^{40, 41} sont des expériences homonucléaires 2D très utiles pour établir des connectivités entre protons voisins. La séquence COSY de base est très simple (2 impulsions séparées par un temps de mélange) et le transfert de polarisation est basé sur l'existence d'un couplage scalaire entre 2 protons, principalement $^2J_{\text{HH}}$ ou $^3J_{\text{HH}}$ (figure 5).

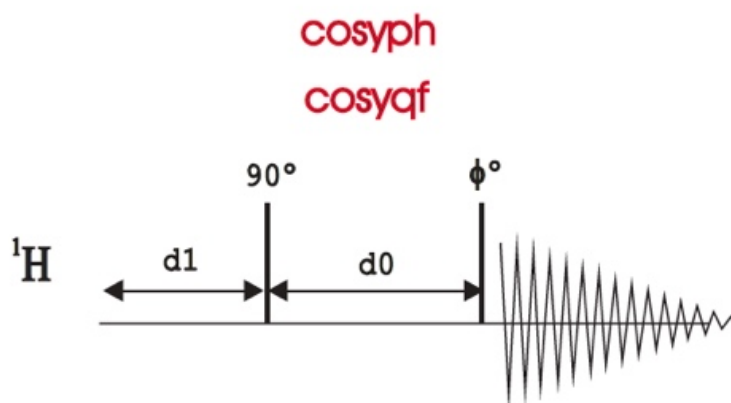


Figure 5 : séquence COSY de base (pulse program cosyph ou cosyqf) issue de la bibliothèque de programmes Bruker. $d1$ est le délai de relaxation et $d0$ le temps de mélange incrémenté qui permet de reconstruire l'évolution de l'aimantation décrite par la 2^{de} dimension du spectre.

La TOCSY utilise un spin lock (verrouillage de spin) qui permet à la polarisation de se propager de proche en proche le long d'une série de protons couplés en $^3J_{\text{HH}}$ (figure 6). La durée du spin lock est variable, autour de 10^{-1} s, et sa durée détermine l'ampleur de la propagation de l'aimantation le long d'un système de spins.

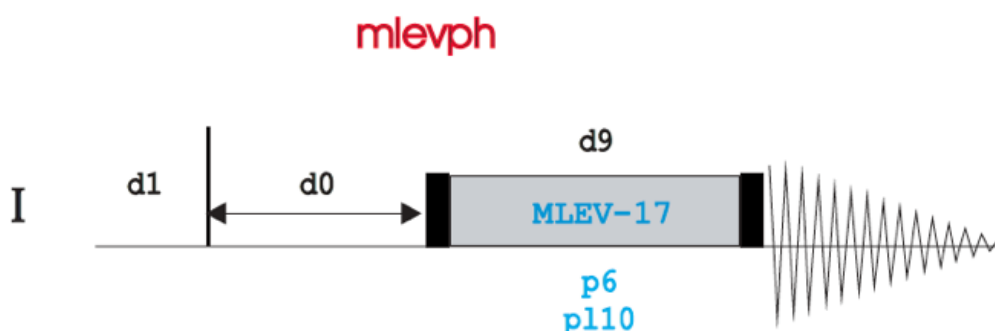


Figure 6 : séquence TOCSY de base (pulse program mlevph) issue de la bibliothèque de programmes Bruker. Un train d'impulsion MLEV-17 permet le transfert de polarisation pendant le délai de spin-lock $d9$.

3.1.2 ^{13}C et HSQC/HMBC

Le second noyau qui nous intéresse est le carbone. L'isotope principal ^{12}C ayant un spin nul, c'est l'isotope ^{13}C qui est observé en RMN. Avec une abondance naturelle de 1,1% et un rapport gyromagnétique 4 fois plus faible que celui du proton, la sensibilité est un facteur limitant pour les expériences d'observation directe du carbone. En conséquence, le recours à des expériences 2D hétéronucléaires basées sur un transfert de polarisation du proton vers le carbone (détection inverse) permet d'obtenir les informations structurales désirées avec des temps d'acquisition raisonnables, en bénéficiant de la sensibilité d'une expérience proton.

hsqcph

^1H

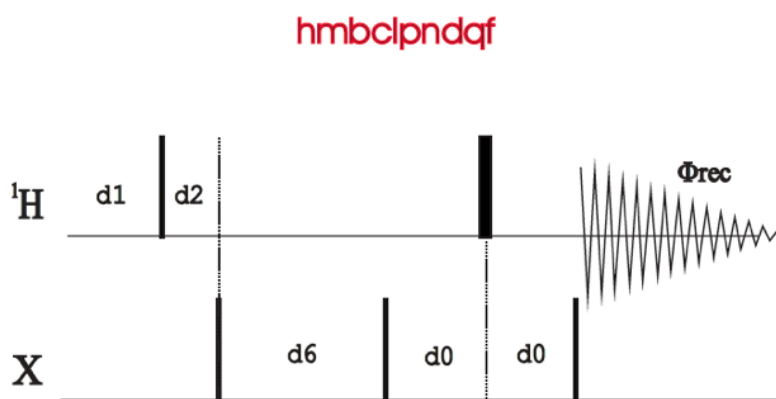
d1 d4 d4 y d4 d4 Φ_{rec}

X

Φ_1 d0 d0 ϵ GARP

p112

L'expérience HMBC (Heteronuclear Multiple Bond Correlation)^{44, 45} montre quant à elle des corrélations scalaires correspondant à l'évolution de couplages scalaires plus faibles, de type $^2J_{CH}$, $^3J_{CH}$ et $^4J_{CH}$. La séquence comporte un filtre « low pass », qui permet de minimiser les signaux issus de couplages $^1J_{CH}$, et un délai d'évolution pour les couplages longues distances qui est réglé sur une valeur moyenne de couplage $^nJ_{CH}$ (en général 8 Hz) (figure 8). Aucun découplage n'est appliqué pendant l'acquisition.



23

L'analyse combinée des spectres COSY, HSQC et HMBC suffit souvent à attribuer la totalité des signaux protons et carbones du squelette carboné d'une molécule organique, pourvu que la résolution des spectres soit suffisante (figure 9).

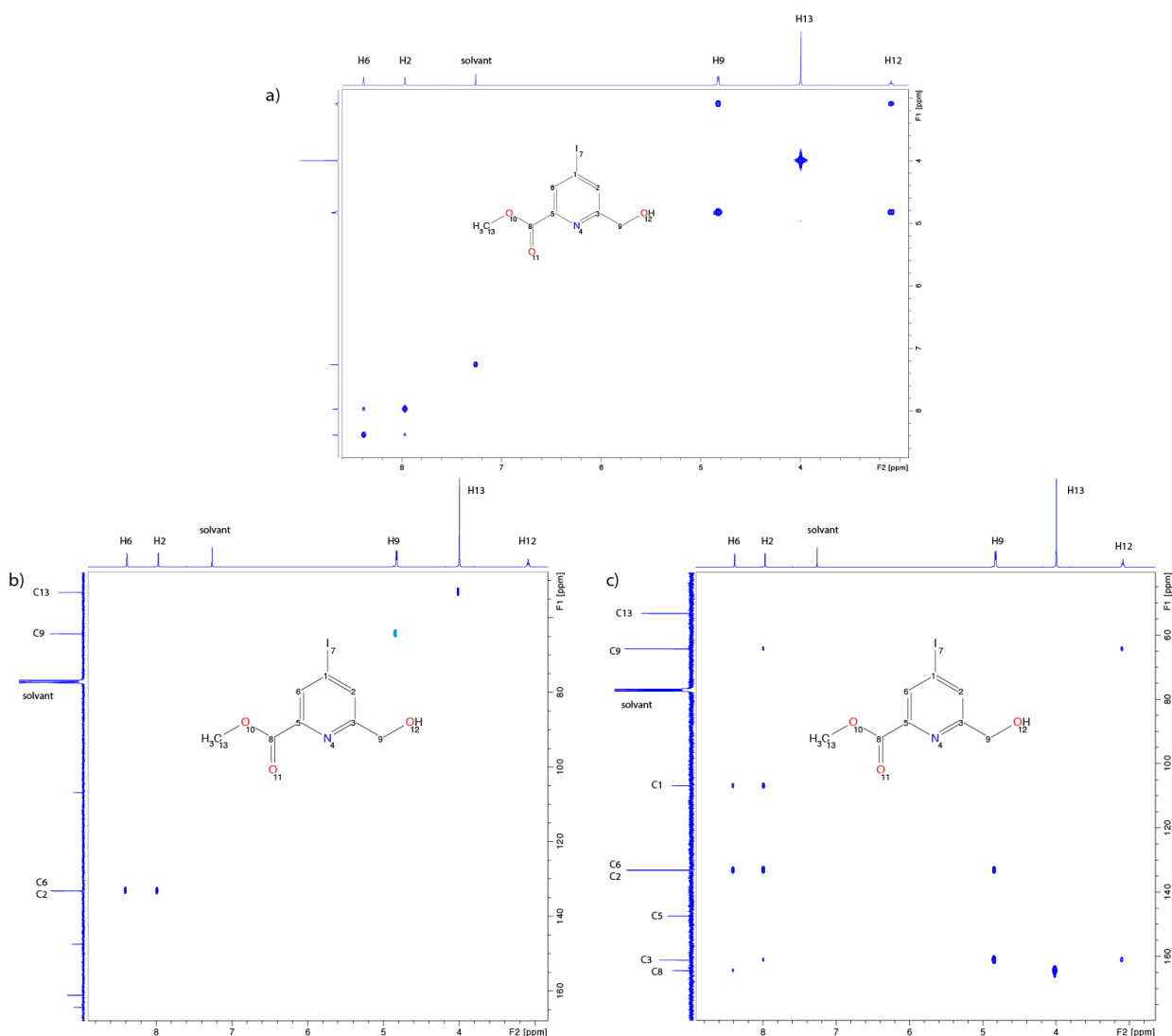
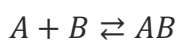


Figure 9 : a) spectre COSY d'une petite molécule organique (solvant CDCl_3), avec son spectre proton 1D en projection F1 et F2. L'attribution des signaux est donnée sur la projection F2. Les taches hors diagonale indiquent des corrélations J_{HH} . En bas, spectres HSQC (b) et HMBC (c) du même échantillon. Les spectres ^1H et ^{13}C (découplé du ^1H) sont utilisés respectivement en projection F2 et F1. Le spectre HSQC montre les corrélations $^1J_{\text{CH}}$ et le spectre HMBC montre des corrélations $^2J_{\text{CH}}$, $^3J_{\text{CH}}$ et $^4J_{\text{CH}}$.

3.2 DYNAMIQUE D'UNE INTERACTION

Dans un grand nombre de systèmes en interaction, le fait que les interactions supramoléculaires soient faibles (i.e. non covalentes) se traduit par le fait que celles-ci vont se créer et se rompre alternativement au cours du temps, conduisant à un équilibre entre des états libres et en interaction qui doivent être pris en compte lors de l'exploration du

système étudié et notamment de la modélisation des observations expérimentales. Prenons l'exemple d'un système composé de 2 espèces A et B s'associant pour donner un complexe AB selon un modèle 1:1.



Équation 1

L'évolution de ce système va être dictée par le profil énergétique que celui-ci va parcourir lors du développement du processus d'interaction.

La figure 10 représente de manière schématique l'évolution de l'énergie d'un système de type protéine-ligand le long de sa coordonnée de réaction. Notons que sur la figure 10 la protéine est notée P et le ligand L.

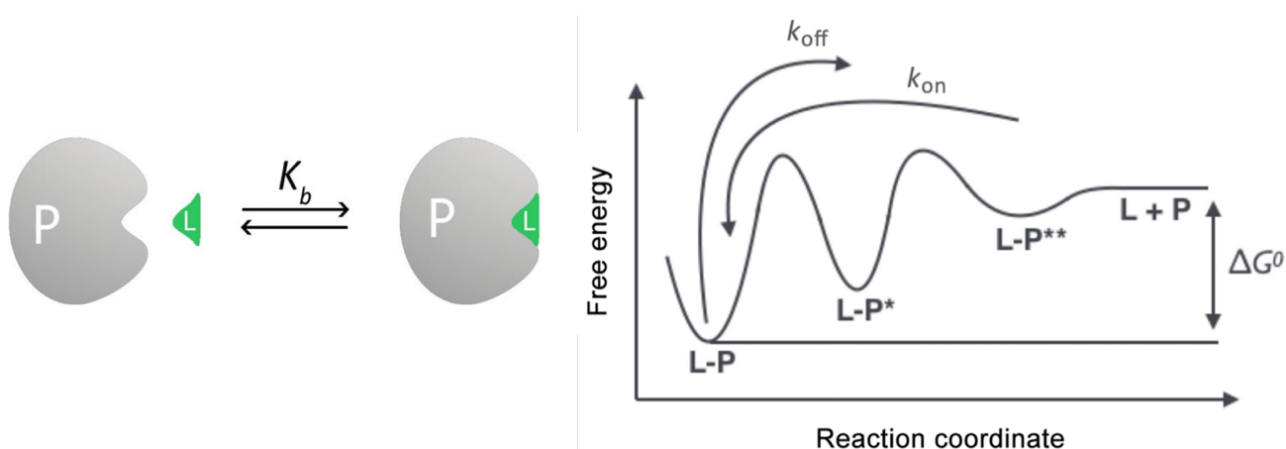


Figure 10 : représentation du profil énergétique d'une interaction entre 2 partenaires, par exemple une protéine P et un ligand L pouvant former un complexe L-P via des interactions non covalentes. L-P* et L-P** représentent des états intermédiaires métastables potentiels. ΔG^0 est l'énergie libre de liaison. Figure issue de ⁴⁶.

Globalement, le système en interaction va passer par des minima locaux d'énergie qui pourront éventuellement être associés à des états intermédiaires d'interaction stabilisés par le processus d'interaction, et des maxima qui correspondent aux barrières énergétiques que le système doit franchir pour que l'interaction se crée ou se rompe. Le profil énergétique de la figure 10 illustre clairement le fait que les caractéristiques thermodynamique – qui dépend de la variation d'énergie libre du système entre l'état libre et en interaction- et cinétique – qui dépend des barrières énergétiques séparant les différents états intermédiaires- sont étroitement liées. Dans la suite, un bref rappel des grandeurs thermodynamiques et cinétiques communément mises en jeu lors de la modélisation d'une interaction réversible 1 :1 est présenté.

3.2.1 Cinétique

Pour un modèle d'interaction 1 :1, le système est caractérisé par les constantes cinétiques de dissociation et d'association k_{off} et k_{on} du complexe AB (figure 10). La valeur de k_{on} étant

souvent gouvernée par la diffusion des solutés (k_{on} compris entre 1.10^8 et $1.10^{10} \text{ M}^{-1}.\text{s}^{-1}$)⁴⁷, le k_{off} est alors une bonne estimation de la force de l'interaction. On définit également la constante $k_{ex} = k_{on} + k_{off}$. k_{ex} est parfois préférée à k_{off} car elle reflète à la fois les valeurs de k_{on} et de k_{off} .

3.2.2 Thermodynamique

Pour que deux partenaires puissent interagir il faut tout d'abord qu'ils se rencontrent. Les mouvements browniens des molécules dans le solvant, et donc leur diffusion, jouent un rôle important dans cette étape préliminaire.⁴⁸ Une fois les molécules en contact, une interaction est possible si elle est associée à une énergie libre de Gibbs standard $\Delta G^0 < 0$ (figure 10). Cette variation d'énergie est composée de 2 termes et dépend de la température T

$$\Delta G^0 = \Delta H^0 - T\Delta S^0 \quad \text{Équation 2}$$

ΔH^0 est la variation d'enthalpie standard du système, l'énergie associée avec la création ($\Delta H^0 < 0$) ou la rupture ($\Delta H^0 > 0$) de liaisons non covalentes. ΔS^0 est la variation d'entropie standard, qui reflète le désordre du système. Lors d'un processus d'interaction, le nombre de degrés de liberté des partenaires d'interaction est susceptible de varier (modification de la dynamique, perte de flexibilité ...). La détermination de la variation d'entropie associée à ce phénomène peut donc apporter une information pertinente sur le processus d'interaction. Plus ΔG^0 est négative, plus l'interaction est favorable. De plus, lorsque le système est à l'équilibre thermodynamique, la composition à l'équilibre du système est déterminée par la constante de dissociation K_d . Pour un système de deux partenaires A et B interagissant pour former un complexe AB on a

$$K_{bd} = \frac{[A][B]}{[AB]} \quad \text{Équation 3}$$

On rappelle que la variation d'énergie libre du système est liée à K_b :

$$\Delta G^0 = -RT \ln \left(\frac{1}{K_d} \right) \quad \text{Équation 4}$$

avec R la constante des gaz parfaits, T la température et K_b la constante d'association à l'équilibre du système.

Par ailleurs, à l'équilibre, les vitesses d'association et de dissociation du complexe sont égales, et on peut relier les deux constantes de vitesse k_{on} et k_{off} à la constante de dissociation K_d :

$$K_d = \frac{[A][B]}{[AB]} = \frac{k_{off}}{k_{on}} \quad \text{Équation 5}$$

3.2.3 Interférences entre processus dynamiques et expérience RMN

Un système en interaction est le siège de multiples phénomènes dynamiques sur des échelles de temps diverses : échanges conformationnels, formation ou rupture de liaisons, association/dissociation... Lorsque ces phénomènes se produisent à une échelle de temps voisine des processus mis en jeu dans l'évolution du système de spins qui est mesuré pendant l'expérience RMN, alors ils peuvent interférer avec l'évolution du signal et peuvent donc être mis en évidence par des expériences spécifiques (figure 11).

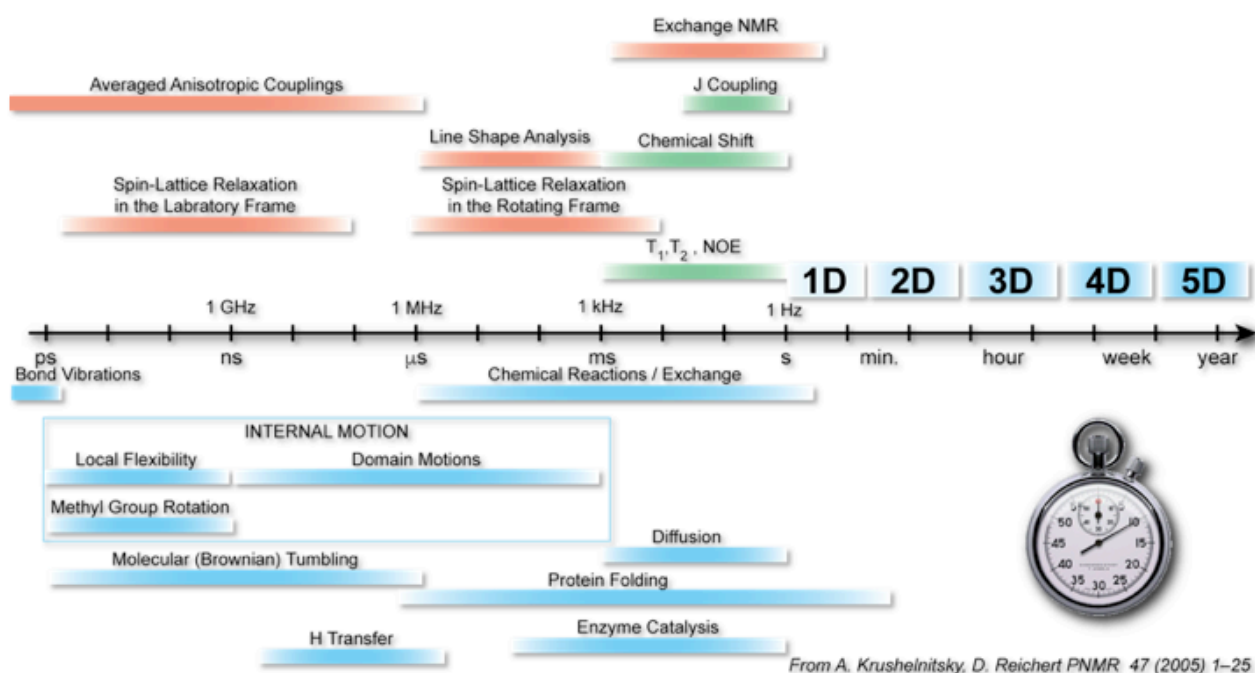


Figure 11 : échelle de temps des phénomènes dynamiques associés à des protéines (en bas, en bleu) et paramètres RMN permettant d'observer ces phénomènes (en haut, en rouge et en vert). Figure adaptée de ⁴⁹.

En particulier, dans le cas des protéines il est possible de sonder une gamme large de phénomènes dynamiques, selon qu'ils se produisent directement à une échelle de temps qui est de l'ordre de l'inverse des fréquences de Larmor des noyaux sondés, ou qu'ils induisent des fluctuations plus lentes susceptibles d'altérer directement la mesure des temps de relaxation, voire l'évolution des interactions de spin comme le déplacement chimique, ou le couplage scalaire. Les techniques de dispersion de relaxation par RMN sont en outre très utiles pour caractériser les interactions dynamiques protéine-ligand. Elles consistent à étudier la dépendance des vitesses de relaxation des spins nucléaires vis-à-vis de la variation du champ magnétique. Dans cet esprit, le temps de relaxation transverse T_2 peut être exploité pour sonder avec précision l'échelle de temps des processus dynamiques susceptibles d'influencer cette relaxation. L'une des applications les plus populaires est la séquence d'écho de spin Carr-Purcell-Meiboom-Gill (CPMG)⁵⁰ qui mesure la relaxation transverse T_2 et permet de caractériser des états peu peuplés, invisibles avec la plupart des autres techniques

d'analyses.^{15, 51, 52} Dans le cas d'un système en échange entre une conformation majoritaire A (99%) et une conformation B (1%) le signal de B n'est probablement pas détectable. Cependant l'échange affecte le signal A dans l'expérience CPMG, ce signal est élargi et donc moins intense car la refocalisation est incomplète. L'intensité du signal de A varie selon le nombre d'impulsions dans la séquence d'écho de spin de l'expérience CPMG, et il est possible de calculer la constante d'échange k_{ex} et le déplacement chimique du signal B à partir de ces données expérimentales (figure 12).

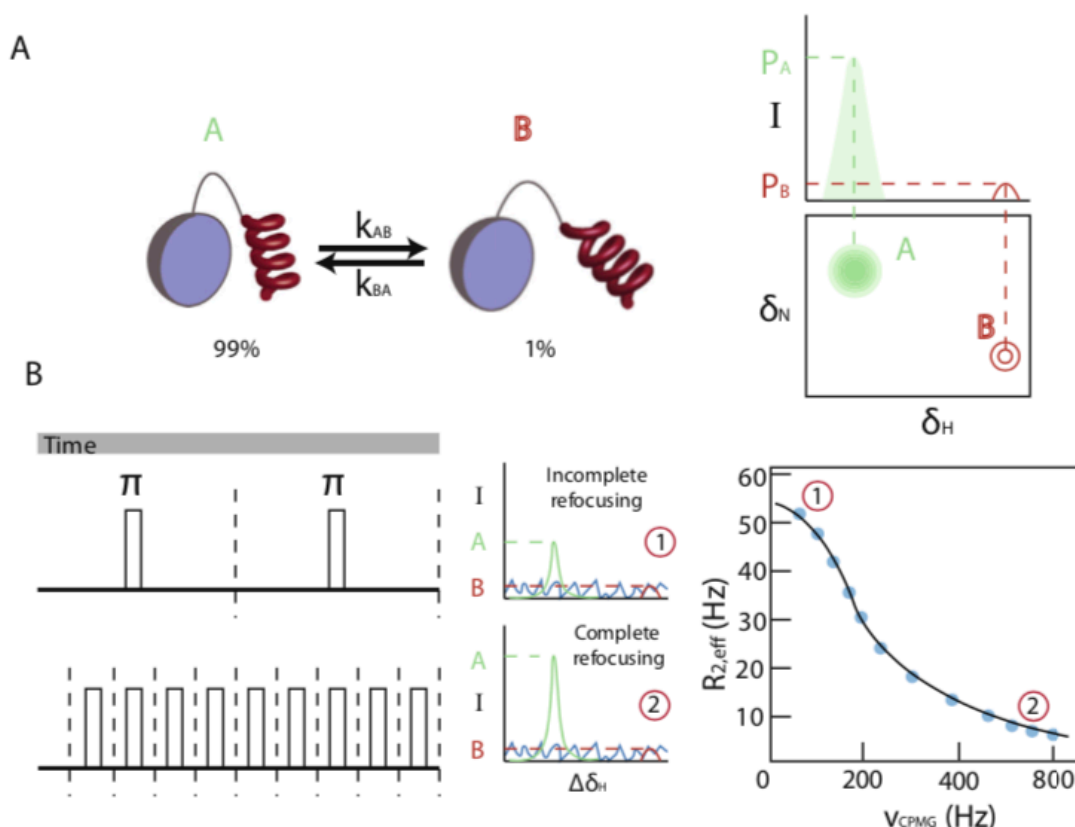


Figure 12 : expérience de dispersion de relaxation. A) description du système avec 2 formes A et B en échange, le signal de B n'est pas détecté sur l'HSQC ^{15}N . B) ① le délai entre 2 impulsions π est assez long pour permettre de nombreux phénomènes d'échange, la refocalisation du signal A est donc incomplète ② le délai est trop court pour permettre l'échange, la refocalisation du signal A est donc totale. Le profil de dispersion représente la vitesse de relaxation transverse efficace $R_{2,eff}$ en fonction de la fréquence des impulsions dans la séquence CPMG. On extrait de ce profil la valeur de k_{ex} ($k_{ex} = k_{AB} + k_{BA}$, c.a.d. $k_{ex} = k_{on} + k_{off}$). Figure issue de ¹⁵.

L'étude de la dispersion de relaxation permet de quantifier, dans le cas d'une protéine, des fluctuations dynamiques de 1 μs à 1 ms, par exemple des changements conformationnels induits par l'interaction avec le ligand ou des états intermédiaires métastables peu peuplés. L'étude de la relaxation longitudinale permet quant à elle d'accéder à des fluctuations de l'ordre de 1 ps à 1 ns (mouvements rapides, plutôt intramoléculaires, liés à l'entropie du système). Une étude exhaustive des paramètres de relaxation d'un système protéine-ligand permet ainsi d'accéder à une large gamme de phénomènes dynamiques.

3.2.4 Influence de K_d sur le spectre RMN d'un système en interaction

De nombreuses expériences RMN permettent en principe d'estimer le régime d'échange et une valeur de K_d . L'allure des signaux d'un simple spectre 1D ^1H peut suffire pour déterminer si la dynamique est rapide ou lente (figure 13). De manière générale, l'échange sera dit lent si le temps de vie de chaque état (molécule libre ou en interaction) est grand devant l'échelle de temps nécessaire pour enregistrer un signal RMN permettant de séparer leurs signaux respectifs. Réciproquement, l'échange sera jugé rapide s'il conduit à des temps de résidence trop courts pour qu'ils puissent être mesurés, et intermédiaire si les échelles de temps mises en jeu (processus d'échange et RMN) sont du même ordre de grandeur. Typiquement, la vitesse d'échange est comparée à la différence de fréquence de résonance du noyau étudié lorsqu'il est dans la molécule libre ou en interaction.⁵³

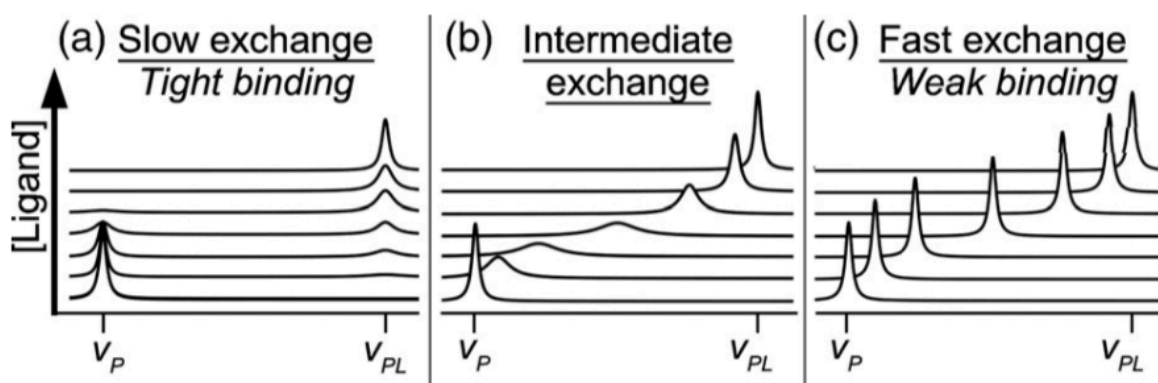


Figure 13 : illustration des 3 régimes d'échange en RMN dans le cas d'une interaction 1:1 protéine-ligand. ν_P représente la fréquence de résonance d'un noyau caractéristique de la protéine libre et ν_{PL} celle du même noyau de cette protéine dans le complexe protéine-ligand. Une titration est réalisée avec une quantité croissante de ligand. Figure issue de ⁵³.

L'observation des spectres 1D enregistrés au cours d'une titration pour un système A-B permet ainsi de déterminer quel est le régime d'échange dans les conditions expérimentales choisies.

- échange lent ($k_{off} \ll \Delta\nu$) où $\Delta\nu$ est la différence de déplacement chimique entre le signal de l'espèce libre et celui de l'espèce liée). Le spectre RMN montre des signaux distincts pour les espèces A et B libres et en interaction. L'intensité des signaux dépend de la concentration de chaque espèce, la valeur de K_d peut donc être calculée à partir des intégrales des signaux, pourvu que le rapport signal/bruit soit suffisant. La force de l'interaction (K_d) influant sur la composition de la solution à l'équilibre, quand l'interaction est faible ($K_d > 100 \mu\text{M}$) les signaux du complexe AB sont peu intenses, voire pas observables.

- échange intermédiaire ($k_{off} \approx \Delta\nu$). Le spectre RMN montre un seul jeu de signaux dont la largeur reflète également le processus d'échange, mais dont l'analyse est complexe. On parle de coalescence pour décrire ce régime d'échange.
- échange rapide ($k_{off} \gg \Delta\nu$). Le spectre RMN montre un seul jeu de signaux, et chaque signal est la moyenne pondérée des valeurs de l'espèce libre et de l'espèce liée. Si le paramètre analysé est le déplacement chimique on observe

$$\delta_{obs} = X_{free}\delta_{free} + X_{bound}\delta_{bound} \quad \text{Équation 6}$$

où δ_{free} et δ_{bound} sont les déplacements chimiques de l'espèce libre et de l'espèce liée et X_{free} et X_{bound} leurs proportions respectives dans l'échantillon.

Dans le cas d'un échange intermédiaire il est souhaitable de modifier les conditions expérimentales afin de se placer dans des conditions d'échange rapide ou lent : il suffit souvent de changer la température de l'échantillon ou l'observable RMN (changement de noyau, mesure de relaxation au lieu du déplacement chimique...).

Les signaux RMN d'un système à l'équilibre diffèrent donc selon les valeurs de K_d (qui détermine la population de spins résonant à chaque fréquence de résonance considérée) et de k_{off} . Dans le cas général où k_{on} est effectivement contrôlé par la diffusion, on considère que le régime d'échange est directement lié à la force de l'interaction : une forte affinité (K_d petit) correspond à un échange lent, une faible affinité (K_d grand), à un échange rapide. Attention cette approximation n'est pas toujours vérifiée, c'est le cas par exemple avec certaines protéines dont la conformation change sous l'action d'une interaction avec un ligand.

3.2.5 Stœchiométrie

La connaissance de la stœchiométrie du système permet de mieux comprendre les aspects dynamiques de l'interaction et notamment de modéliser l'équilibre afin de déterminer la force de l'interaction et la stabilité du complexe. Le cas le plus simple d'interaction implique 2 partenaires A et B, mais des systèmes plus complexes peuvent être observés, notamment si l'un des partenaires est de grande taille. Une protéine présente souvent plusieurs sites d'interaction possibles, et dans ce cas un ou plusieurs sites peuvent être occupés selon les ligands et les conditions expérimentales.^{27, 54}

Une interaction à 2 partenaires peut être décrite par l'équation suivante



Si $n = m = 1$, on parle de modèle 1:1, c'est l'hypothèse la plus simple à la base de l'étude d'un nouveau système. Si un modèle 1:1 ne permet pas d'expliquer les données

expérimentales alors il faut tester l'hypothèse d'un système plus complexe, avec par exemple un modèle 1:2 ou 2:1.⁵⁵

La stœchiométrie d'un système 1:1 peut être vérifiée par la méthode de Job, qui exploite les variations de déplacement chimique au cours d'une simple titration, si le système est en échange rapide ou lent.⁵⁵ Cependant cette méthode a des limites d'applications : les partenaires doivent rester solubles tout au long de la titration et un seul type d'adduit doit être présent. L'analyse de la distribution des résidus est une méthode plus adaptée à l'étude de systèmes avec une stœchiométrie composite.⁵⁶ En outre, avec un système complexe, les données expérimentales peuvent être ajustées selon plusieurs modèles. L'interprétation des résultats doit donc être prudente, et il est souhaitable de tester plusieurs ajustements, voire de réaliser plusieurs titrations, en faisant varier la concentration ou le paramètre observé (déplacement chimique ^{19}F ou ^{31}P , nOe, mesure de diffusion...). La comparaison avec des données de cristallographie, de modélisation moléculaire, ou toute autre approche permettant d'apporter une information structurale pertinente peut permettre d'affiner le modèle en suggérant une stœchiométrie préférentielle.²⁷

4 - MÉTHODES RMN SPÉCIFIQUES AUX SYSTÈMES PROTÉINE/LIGAND

In vivo, les protéines interagissent avec des ligands très variés et ces interactions sont souvent à l'origine de mécanismes liés à leur fonction. Les protéines étant des molécules de grande taille (plusieurs dizaines ou centaines de kg.mol^{-1}), il est intéressant d'observer quelle région est plus spécifiquement impliquée dans une interaction.

La protéine et le ligand, du fait de leurs natures et de leurs tailles en principe très différentes, ont des propriétés RMN différentes à l'état libre en solution (figure 14). L'interaction protéine-ligand modifie l'environnement chimique des 2 partenaires, et peut entraîner des modifications d'ordre conformationnel et dynamique. Ces modifications affectent divers paramètres RMN (relaxation transverse T_2 , déplacement chimique, nOe) et les spectres RMN sont donc différents selon que les partenaires sont libres ou en interaction. L'observation de la perturbation engendrée sur les spectres peut donc être exploitée pour déterminer s'il y a interaction et la caractériser.

Selon les systèmes, de nombreuses techniques RMN ont été mises au point pour caractériser ces interactions en observant soit le ligand, soit la protéine. Certaines de ces méthodes s'intéressent plus particulièrement au site d'interaction, souvent appelé site actif, sur la protéine.^{9, 57}

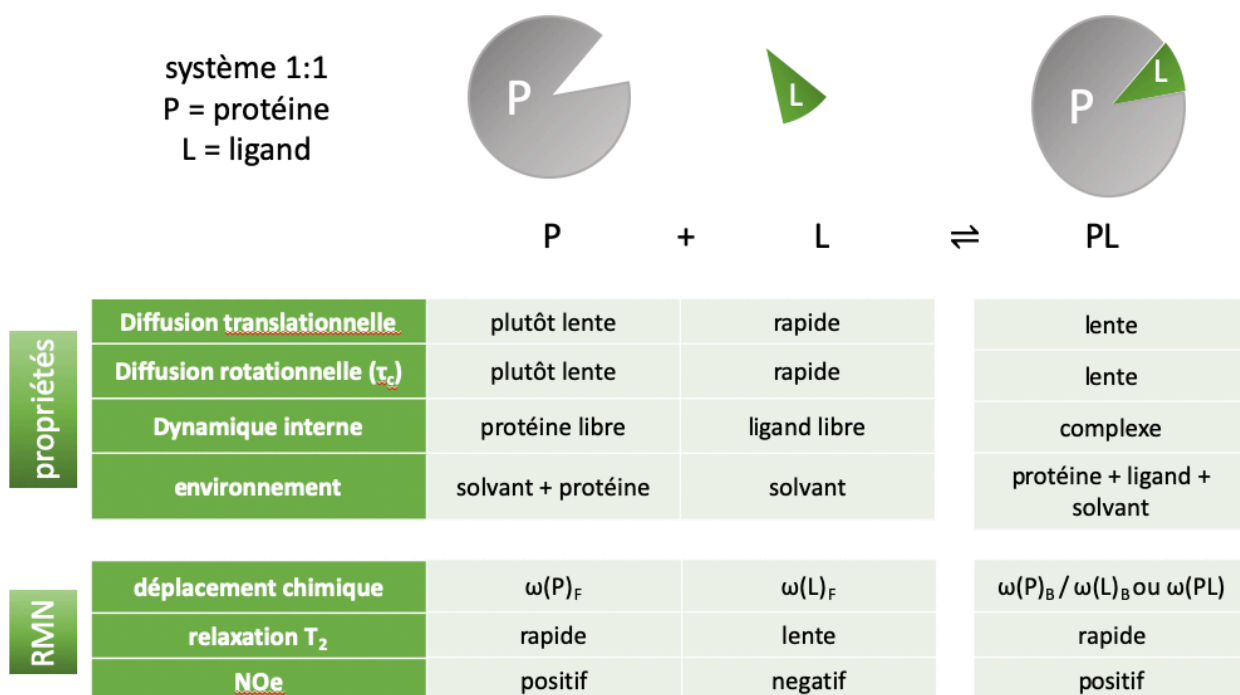


Figure 14 : schéma d'une interaction typique protéine-ligand (exemple d'une interaction 1:1) illustrant quelques propriétés affectées par l'interaction et l'impact sur certains observables RMN. La notation ω_F représente le déplacement chimique libre (Free) et ω_B le déplacement chimique lié (Bound).

4.1 MÉTHODES RMN BASÉES SUR L'OBSERVATION DU LIGAND

La majorité des ligands sont des molécules organiques de petite taille (10 à 10000 fois plus petites que les protéines étudiées). A l'état libre, en solution, le ligand est très mobile (temps de corrélation τ_c très court). Quand il est complexé avec une protéine ses mouvements sont donc ralentis car il est solidaire d'un objet beaucoup plus gros. Ce changement affecte certains de ses paramètres RMN comme la relaxation transverse caractérisée par le temps de relaxation T_2 ou la relaxation croisée dont une grandeur caractéristique est le facteur nOe. L'observation de ces paramètres permet donc en théorie de déterminer si un ligand est à l'état libre ou s'il est complexé.

L'intérêt de ces méthodes est multiple : (i) elles ne nécessitent pas de connaissance préalable de la structure de la protéine ; (ii) elles sont adaptées à de grosses protéines (plus de 30 kDa) ; (iii) une faible concentration en protéine est nécessaire ; (iv) aucun marquage isotopique de la protéine n'est nécessaire ; (v) elles sont adaptées à des interactions relativement faibles (K_d entre 10 mM et 1 nM).

La méthode STD (Saturation Transfert Difference)⁵⁸ par RMN est une bonne illustration de ce type d'approche. Cette expérience est basée sur un transfert de saturation d'une protéine

vers son ligand. Un spectre RMN ^1H « on resonance » est enregistré, avec une saturation des signaux de la protéine par le biais d'impulsions sélectives. La saturation se transmet aux ligands complexés (le temps de saturation doit être de 1 à 2 secondes dans ce but) et elle est détectée chez les ligands en solution. Un second spectre « off resonance » est enregistré sans saturation de la protéine. Le spectre STD est la différence de ces 2 spectres : on y observe seulement les signaux d'un ligand, résultat du transfert de saturation permis par l'interaction avec la protéine (figure 15).

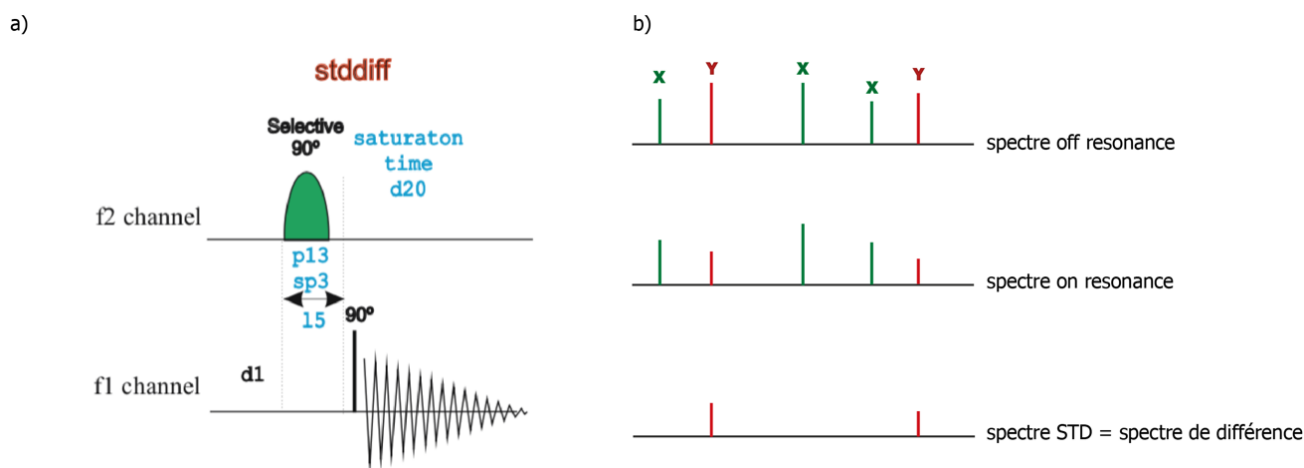


Figure 15 : a) séquence STD de base issue de la bibliothèque de programmes Bruker. L'impulsion sélective de durée p13 est appliquée à la fréquences « off » ou à la fréquence « on », elle est répétée n fois et $n \cdot p13 = \text{temps de saturation d20}$ b) illustration des spectres off résonance, on résonance et STD d'un échantillon composé d'une protéine et de 2 ligands potentiels. Le spectre de différence montre les signaux du ligand Y tandis que les signaux de la molécule X ont été soustraits, ce qui indique que X n'est pas un ligand.

La méthode STD permet d'analyser des mélanges complexes de ligands potentiels et est ainsi utilisée pour du criblage en drug discovery. Il est possible, sous certaines conditions, d'identifier quels atomes du ligand sont directement impliqués dans l'interaction, on parle de Group Epitope Mapping.⁵⁹ Cependant si l'on veut déterminer le site actif de la protéine il faut utiliser une autre méthode d'analyse.

4.2 MÉTHODES RMN BASÉES SUR L'OBSERVATION DE LA PROTÉINE

Les méthodes basées sur l'observation de la protéine nécessitent une assez grande quantité de protéine, et un marquage isotopique ^{15}N et/ou ^{13}C , voire ^2H pour les protéines de masse supérieure à 100 kDa. Cependant ces techniques permettent d'identifier quels acides aminés sont impliqués dans l'interaction et constituent le(s) site(s) actif(s), pourvu que l'attribution de la protéine soit connue.⁶⁰

Un spectre HSQC ^{15}N ou TROSY (pour les grosses protéines) est enregistré pour la protéine seule et un second spectre, obtenu en présence d'un ligand, lui est comparé. Dans le cas

d'un système en échange rapide, les signaux représentent la moyenne pondérée des déplacements chimiques de la protéine libre et de la protéine complexée au ligand. Les signaux dont le déplacement chimique varie entre les 2 spectres montrent les acides aminés impliqués dans l'interaction, ou tout du moins affectés par la présence du ligand dans le site actif. Dans le cas d'un échange lent on observe 2 jeux de signaux, pour la protéine libre (δ_F) et pour la protéine liée (δ_B). L'intensité des signaux F diminue avec l'ajout de ligand au cours de titration, tandis que l'intensité des signaux B augmente (figure 16).

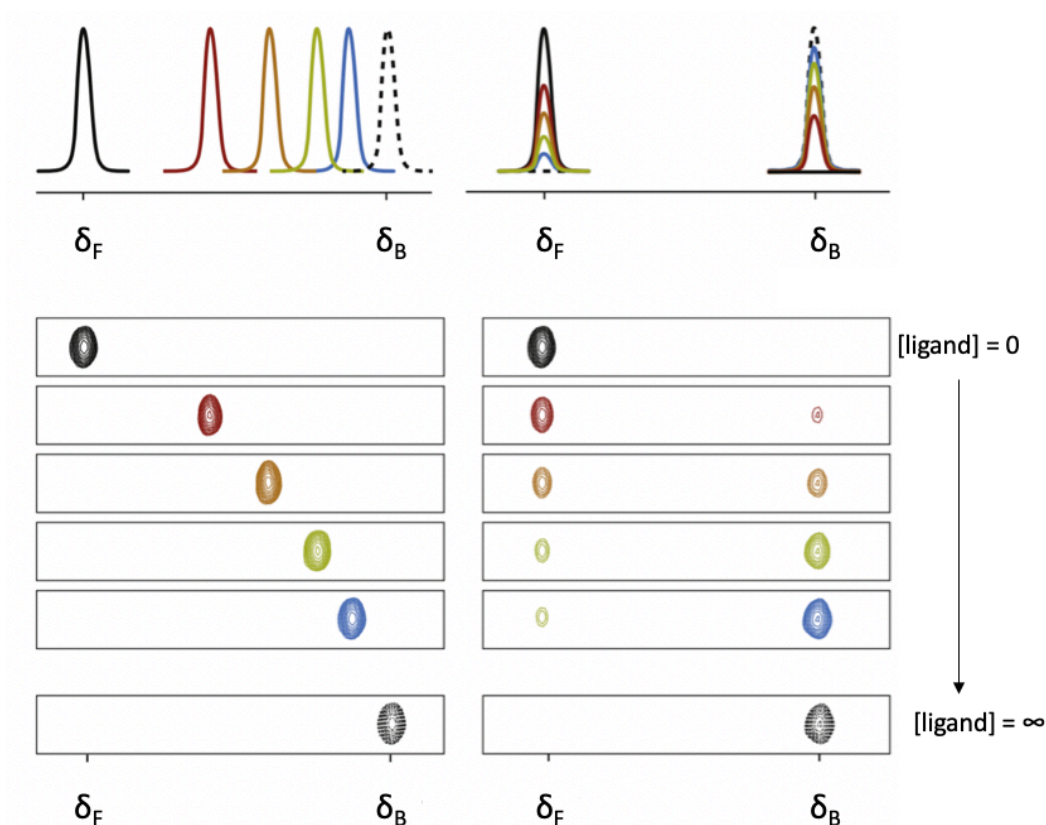


Figure 16 : illustration de la titration d'une protéine par un ligand. A gauche, échange rapide, le déplacement chimique d'un signal varie selon que la protéine est libre (δ_F) ou plus ou moins complexée (δ_B). A droite, échange lent, l'intensité du signal de la protéine libre diminue alors que celle du signal de la protéine complexée augmente. Figure issue de ⁶¹.

Ces méthodes sont les plus couramment utilisées pour identifier des ligands de protéines, identifier le site actif et caractériser l'interaction. Cependant elles ne sont pas toujours les plus pertinentes à mettre en œuvre. Dans le cas où le ligand est un complexe de lanthanide, le paramagnétisme intrinsèque de ces éléments est un facteur important à prendre en compte au moment du choix des expériences. Il peut certes perturber certaines mesures, notamment en affectant la relaxation des noyaux voisins, mais il peut surtout être exploité pour la caractérisation de structure ou paramètres dynamiques,⁶² surtout s'il est associé à une technique RMN polyvalente comme la mesure de diffusion.⁶³

5 - COMPLEXES DE LANTHANIDE POUR LA CRISTALLISATION DE PROTÉINES

Notre équipe étudie depuis une quinzaine d'années des complexes de lanthanides qui montrent des propriétés intéressantes pour la cristallisation de protéines : (i) ils agissent comme agent nucléant lors d'expérience de co-cristallisation, (ii) les propriétés de diffusion anormale des éléments f permettent la résolution du problème des phases lors des expériences de cristallographie par diffraction des rayons X, (iii) leur luminescence permet de détecter facilement leur présence dans un cristal, et (iv) leur paramagnétisme permet en outre d'obtenir des informations structurales en solution par RMN (figure 17).^{27-29, 64, 65}

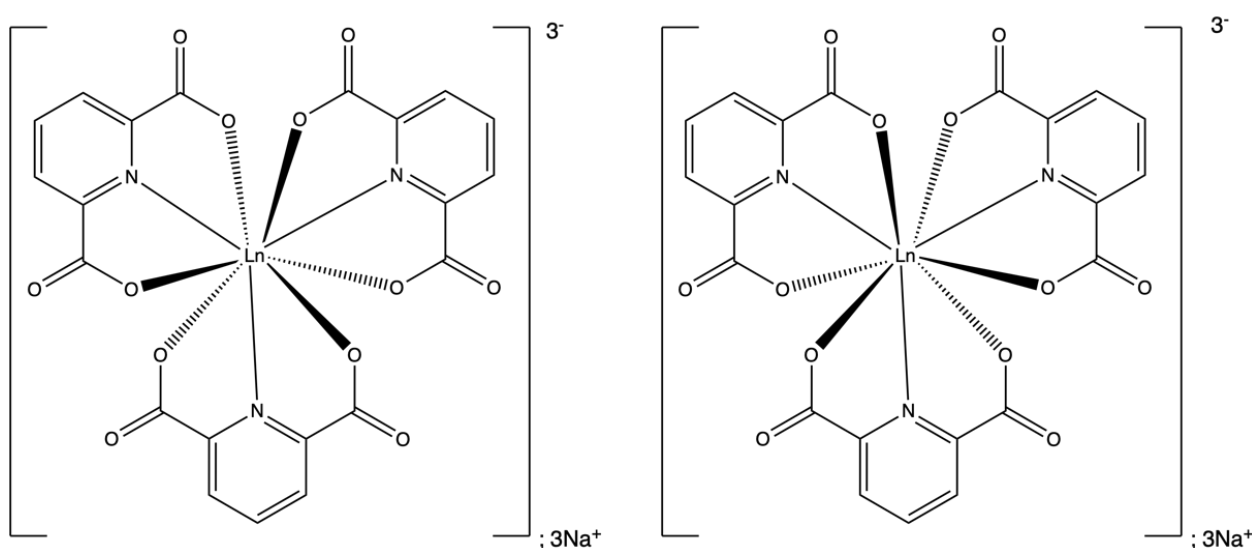


Figure 17 : complexe de lanthanide tris-dipicolinate $[Na]_3[Ln(DPA)_3]$, énantiomère Λ (à gauche) et Δ (à droite)

5.1 UN BON AGENT DE CRISTALLISATION

Les complexes de tris-dipicolinate de lanthanide (figure 17) ont montré leur capacité à co-cristalliser avec des protéines variées, permettant dans certains cas d'observer une maille cristalline inédite (HEWL, xylanase).²⁸ Les cristaux obtenus ont pu être analysés par DRX, le lanthanide servant d'agent de diffusion anormale. L'observation des structures résolues montre le complexe de lanthanide en interaction avec les chaînes latérales de certains acides aminés à charge positive : arginine, lysine ou histidine. La nucléation a lieu dans le milieu de cristallisation et il ne faut donc pas se contenter d'observer le système à l'état solide. Une étude en solution permettrait d'étudier les différents mécanismes à l'origine de l'interaction.

5.2 PROPRIÉTÉS PARAMAGNÉTIQUES

La famille des ions lanthanides Ln^{3+} présente des propriétés paramagnétiques variées bien que la taille des noyaux varie peu. Par ailleurs, l'affinité d'une protéine pour un complexe de lanthanide est similaire quel que soit l'ion dans le complexe. Il est donc possible d'exploiter les propriétés des différents complexes d'ions Ln^{3+} pour sonder les structures des systèmes impliquant des protéines interagissant avec ceux-ci. Le paramagnétisme des complexes de lanthanides ouvre notamment la voie à la mise en œuvre des techniques de RMN paramagnétique, que ce soit pour l'étude des échantillons microcristallins lorsque la protéine a co-cristallisé avec le complexe de lanthanide,⁶⁵ ou en solution pour les protéines pour lesquelles il est impossible d'obtenir des cristaux.⁶² Afin de développer cette méthodologie, il semble donc pertinent d'étudier l'interaction entre $[\text{Ln}(\text{DPA})_3]^{3-}$ et une protéine non seulement à l'état solide mais aussi en solution.

5.3 ÉTUDE D'UN SYSTÈME MODÈLE IMPLIQUANT UNE PETITE MOLÉCULE

Une étude a été menée préalablement dans notre équipe, avec de petites molécules mimant les chaînes latérales des acides aminés susceptibles d'interagir avec les complexes de trisdipicolinates (arginine, lysine et histidine). De tels systèmes sont évidemment bien plus simples à étudier que des protéines mais permettent d'obtenir des informations sur le détail des interactions supramoléculaires qui peuvent être exploitées pour déchiffrer ces interactions au sein des protéines.

Le premier système choisi impliquait un complexe $[\text{Tb}(\text{DPA})_3]^{3-}$ et un cation ethylguanidium (EtGua^+), mimant la chaîne latérale de l'arginine. Des cristaux de $[\text{EtGua}]_3[\text{Tb}(\text{DPA})_3] \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ont été analysés par DRX, et des expériences de titration par RMN ^1H ont été réalisées en solution. Le spectre RMN ^1H montrait un système en échange rapide selon la définition de la figure 13. Les variations de déplacements chimiques observées pour le cation étaient importantes dès les premiers points de la titration, alors que la concentration en complexe était encore faible, en raison du fort paramagnétisme de l'ion Terbium (III). Les résultats de la titration montraient un système modélisé par 3 équilibres successifs en solution pour former les adduits 1:1, 2:1 et 3:1 $\text{EtGua}^+ / [\text{Tb}(\text{DPA})_3]^{3-}$ (figure 18).

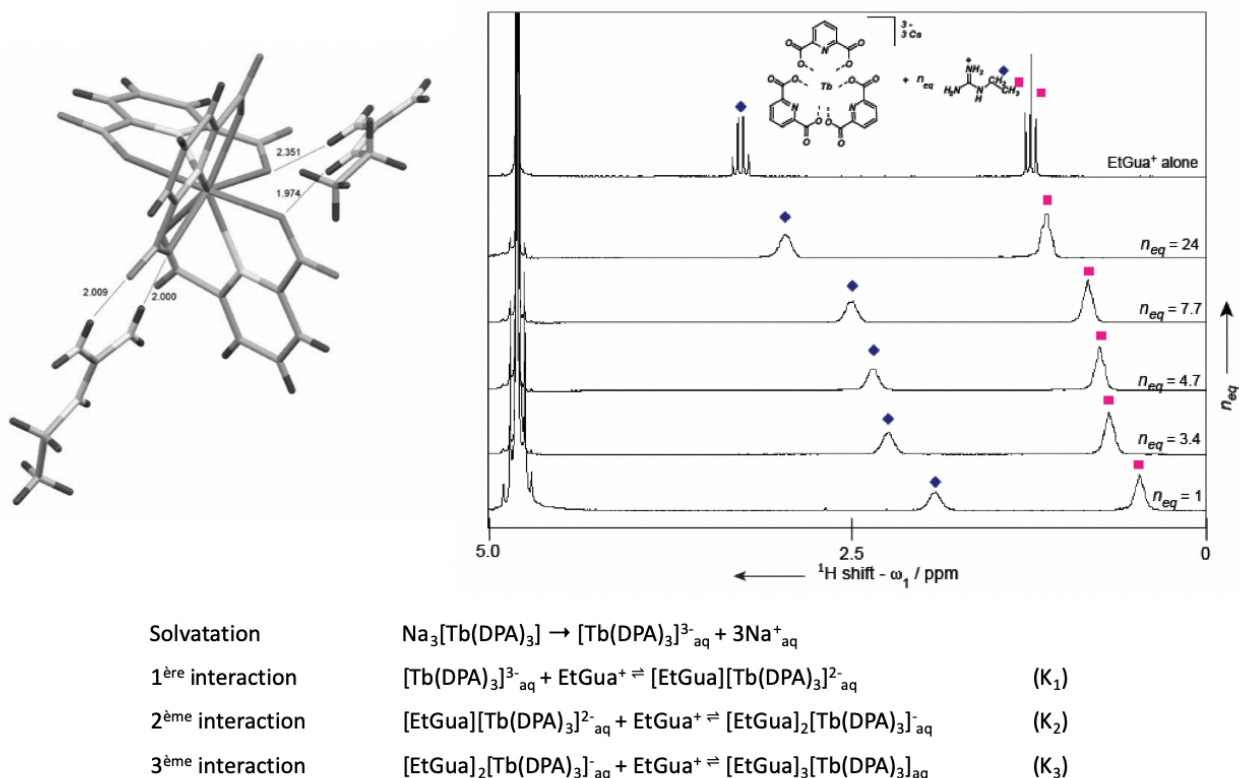


Figure 18 : illustration de l'étude du système $\text{EtGua}^+ / [\text{Tb}(\text{DPA})_3]^{3-}$ par cristallographie et RMN en solution. Les constantes d'association sont déterminées à partir des données de RMN avec $K_1 = 61 \pm 11$, $K_2 = 17 \pm 4$ et $K_3 = 4 \pm 0,5$. Figure adaptée de ²⁷.

Dans un 2^{ème} temps les systèmes impliquant des ions ethylammonium et imidazolium, mimant respectivement les chaînes latérales de la lysine et de l'histidine, ont été étudiés de la même façon.^{29, 66} Une étude de Modélisation Moléculaire menée en parallèle de l'étude expérimentale mit en lumière de légères différences dans le mode d'interaction entre les 3 systèmes d'une part et entre l'état solide et en solution d'autre part.

Les complexes de tris-dipicolinates se montrent très intéressants pour la résolution de structure des protéines. Ils peuvent aider la nucléation d'un cristal et sont de bons agents de diffusion anormale pour la DRX. En outre la présence d'un ion lanthanide (III) paramagnétique permet d'utiliser des techniques de RMN paramagnétique, et ce aussi bien en RMN solide que liquide. Tout cela est rendu possible par des interactions non-covalentes entre le complexe anionique et certains acides aminés cationiques. L'étude de systèmes simples reproduisant les chaînes latérales de ces acides aminés a permis de mieux comprendre les mécanismes impliqués dans ces interactions. La prochaine étape consiste à étudier des systèmes plus complexes impliquant un peptide ou une protéine. De tel systèmes peuvent être étudiés à l'état solide par DRX,²⁹ tandis que la RMN est adaptée à l'étude en solution de ces systèmes dynamiques.

6 - ÉTUDE PAR RMN DE L'INTERACTION ENTRE UN COMPLEXE DE LANTHANIDE ET UNE PROTÉINE

Les expériences de titration par RMN ^1H déjà utilisées sur les systèmes simples impliquant de petites molécules peuvent tout à fait être appliquées à l'étude d'interactions avec une protéine. Les techniques de RMN paramagnétique sont applicables, et exploitent la versatilité du complexe de lanthanide : il est possible de modifier l'ion lanthanide dans le complexe selon le paramètre RMN à mesurer, et ce sans modifier de façon significative l'interaction. Une autre technique RMN, qui permet de mesurer la diffusion de composés en solution, semble intéressante pour l'analyse de ces systèmes. Le paramagnétisme peut cependant poser problème avec ce type de mesure et une étude préliminaire sera nécessaire pour évaluer l'impact du paramagnétisme sur la mesure de diffusion.

6.1 RMN PARAMAGNÉTIQUE

La plupart des ions lanthanides Ln^{3+} ont des propriétés paramagnétiques qui les rendent intéressants pour la détermination de structures par RMN.^{62, 67, 68} Le paramagnétisme peut affecter le déplacement chimique et/ou la relaxation des noyaux dans son entourage, à plus ou moins longue distance selon le lanthanide (figure 19). On parle respectivement de PCS (Pseudo Contact Shift) et de PRE (Paramagnetic Relaxation Enhancement).

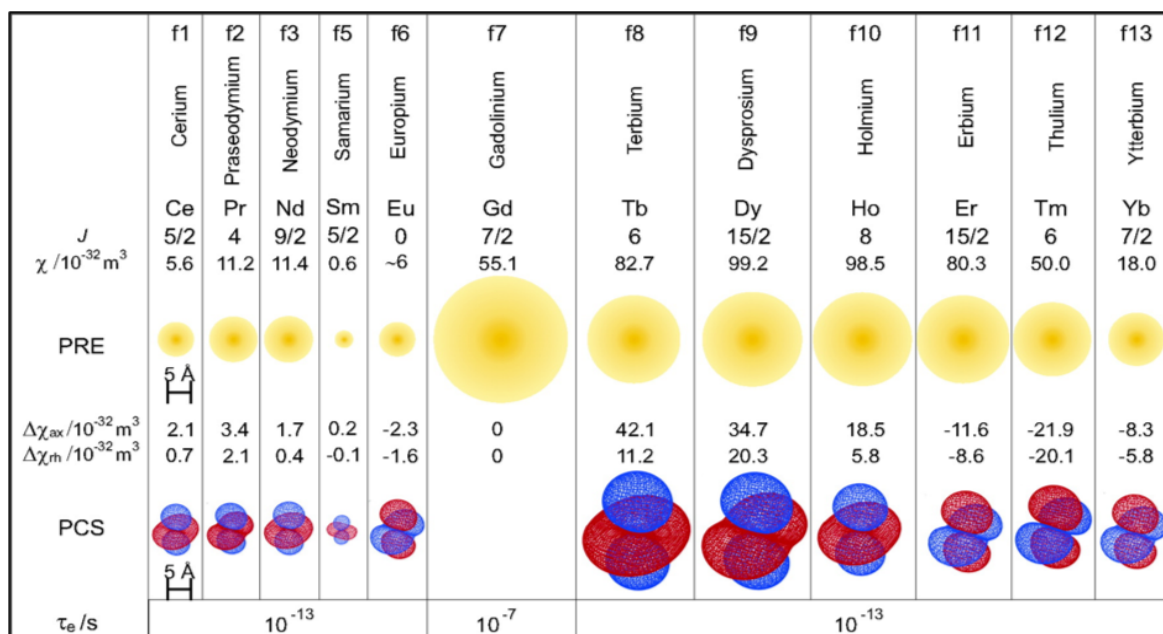


Figure 19 : propriétés paramagnétiques des ions Ln^{3+} (les espèces diamagnétiques ne sont pas montrées). Le rayon de la sphère jaune montre la distance à laquelle le PRE d'un ion élargit de 80 Hz un signal ^1H de protéine ($\tau_c = 15 \text{ ns}$; champ magnétique 18,8 T). Les isosurfaces (qui représentent le tenseur paramagnétique anisotropique $\Delta\chi$) montrent les PCS de $\pm 5 \text{ ppm}$. Figure issue de ⁶².

6.1.1 PCS

La présence d'un centre paramagnétique affecte le déplacement chimique des noyaux voisins. Cette variation de déplacement chimique, ou δ^{para} , est la somme de 2 composantes appelées FCS et PCS.⁶⁹

$$\delta^{para} = FCS + PCS \quad \text{Équation 8}$$

Le FCS (Fermi Contact Shift) est issu d'une interaction propagée à travers les liaisons covalentes (4 à 5 liaisons au maximum).⁶⁹ Dans le cas de systèmes basés sur des liaisons faibles, il est considéré comme négligeable. On peut alors faire l'approximation $\delta^{para} = PCS$.

Le PCS (Pseudo Contact Shift) provient d'interactions à travers l'espace avec les électrons célibataires du centre paramagnétique. Le PCS dépend à la fois de la distance par rapport au centre paramagnétique (avec une dépendance en r^{-3} , où r est la distance entre les noyaux) et de l'orientation du noyau observé par rapport au tenseur d'anisotropie paramagnétique χ .⁷⁰

Le δ^{para} et donc le PCS, est déterminé de façon expérimentale. Un spectre est enregistré en présence d'un ion lanthanide diamagnétique (Lu^{3+} ou La^{3+}), les déplacements chimiques observés sont appelés δ^{dia} . Un spectre est alors enregistré en présence de l'ion paramagnétique d'intérêt, et les déplacements chimiques observés sont appelés δ^{obs} . Le PCS est la différence entre ces 2 valeurs.

$$PCS = \delta^{para} = \delta^{obs} - \delta^{dia} \quad \text{Équation 9}$$

Grâce au fort paramagnétisme de certains lanthanides, les PCS donnent des informations à longue distance (jusqu'à 40 Å)⁷¹ et sont utilisés dans la détermination de structure de protéines par RMN.⁷² En combinant les PCS mesurés avec différents complexes de lanthanides paramagnétiques (figure 20) il est possible de déterminer la structure du système protéine-complexe et d'identifier le ou les sites d'interaction du complexe sur la protéine.⁷³

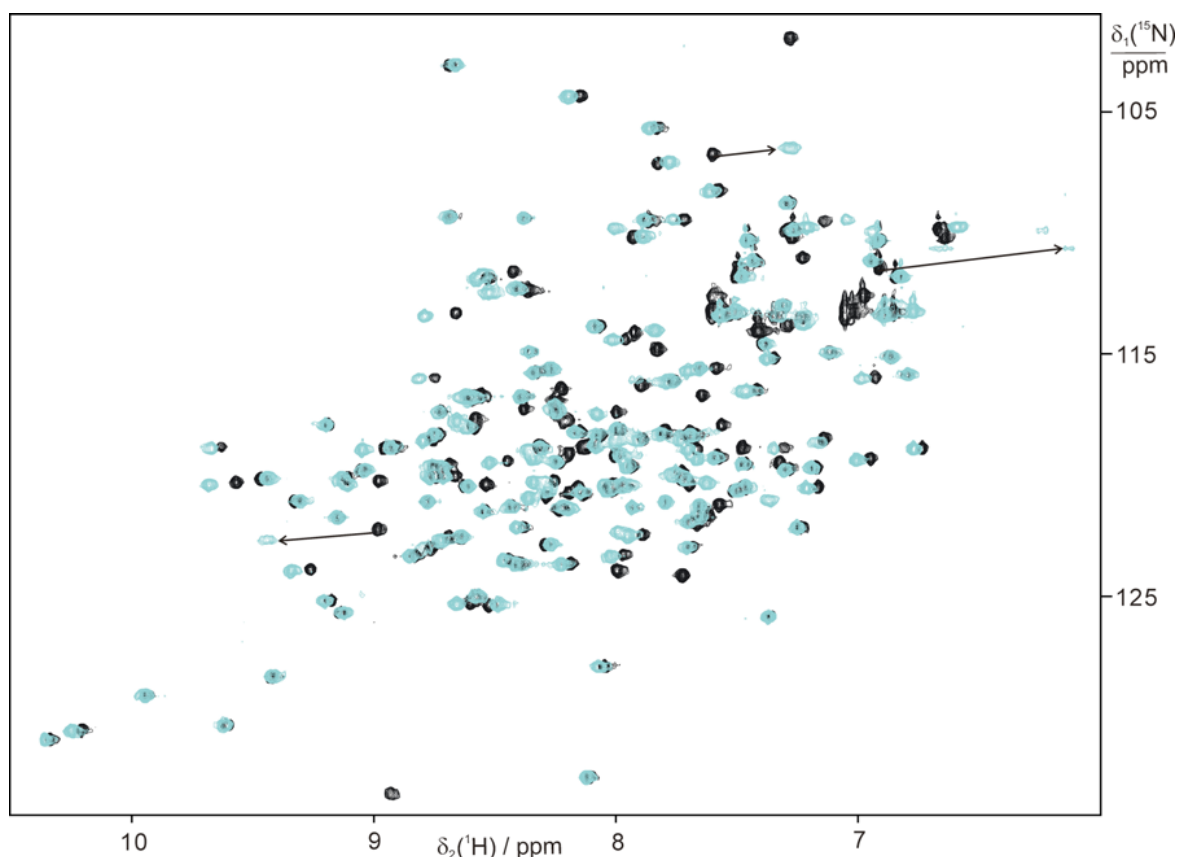


Figure 20 : exemple de PCS observés pour le lysozyme HEWL : spectres ^{15}N -HSQC de la protéine en présence de $[\text{Y}(\text{DPA})_3]^{3-}$ diamagnétique (en noir) ou de $[\text{Tb}(\text{DPA})_3]^{3-}$ paramagnétique (en bleu clair). Les variations de déplacement chimique les plus importantes sont indiquées par des flèches. Figure issue des SI de ⁷³.

6.1.2 PRE

Les centres paramagnétiques affectent non seulement le déplacement chimique des atomes à proximité, mais aussi leur relaxation. Deux mécanismes, impliquant les électrons célibataires du centre paramagnétique, participent au PRE : une interaction dipolaire (selon les équations de Solomon-Bloembergen) avec une dépendance en r^{-6} , et un mécanisme appelé relaxation de Curie.^{62, 74}

Dans la série des lanthanides le Gadolinium (III) se démarque des autres noyaux en raison de sa configuration électronique $4f^7$ (couches f à demi remplies): ses électrons célibataires sont répartis dans chaque orbitale f et forment donc un environnement isotrope et en conséquence le temps de relaxation électronique est long, alors qu'il est très court pour les autres lanthanides. La contribution de Curie est ainsi négligeable et le PRE induit par le Gadolinium (III) est principalement gouverné par la contribution dipolaire, avec une dépendance en r^{-6} . Le fort paramagnétisme du Gadolinium(III) affecte fortement les temps

de relaxation des noyaux voisins, sans aucune modification des déplacements chimiques. Ces propriétés l'ont rendu très populaire pour la synthèse d'agents de contraste pour l'IRM⁷⁵ et pour étudier la surface des protéines.⁷⁶

Le PRE est déterminé expérimentalement en mesurant la relaxation en présence d'un complexe de lanthanide diamagnétique (la vitesse de relaxation est appelée ρ^{dia}) puis de Gadolinium (III) (la vitesse de relaxation est appelée ρ^{obs}), le PRE étant la différence entre ces 2 valeurs.

$$PRE = \rho^{obs} - \rho^{dia}$$

Équation 10

Une approche qualitative consiste à observer la disparition des signaux affectés par le PRE, sur une carte HSQC ¹⁵N de protéine notamment (figure 21). Ceci permet d'identifier les résidus les plus proches du lanthanide, soit parce qu'ils sont impliqués directement dans l'interaction soit parce qu'ils sont à proximité du site actif.

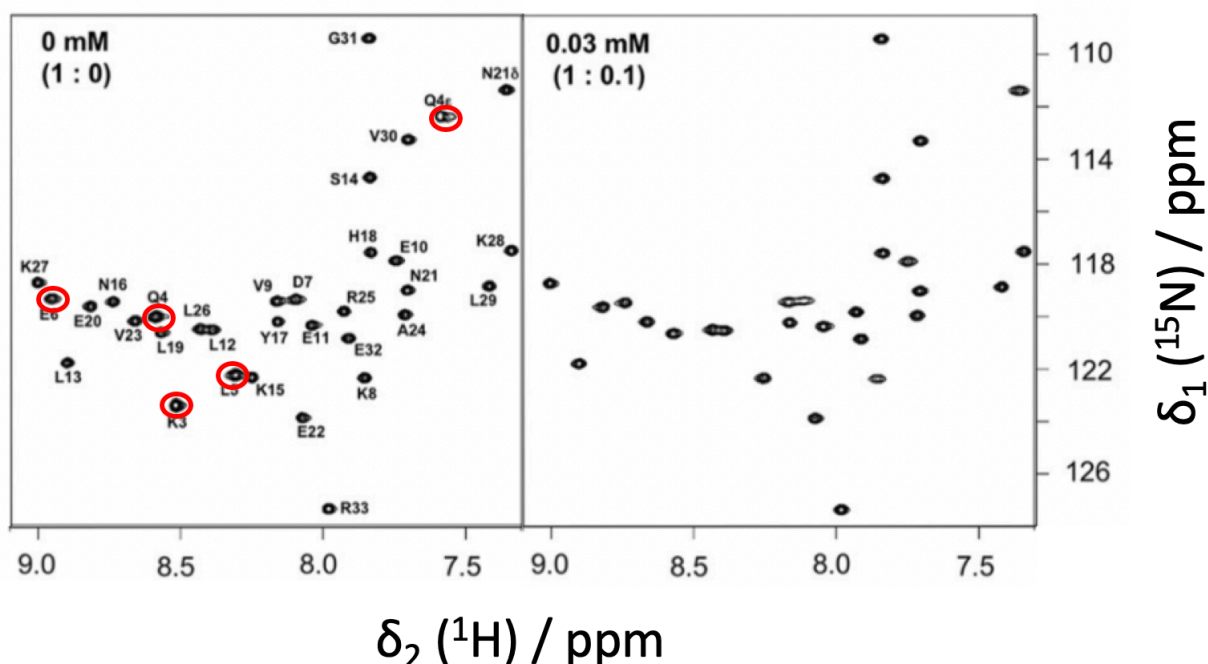


Figure 21 : ¹⁵N HSQC d'une solution de protéine GCN4 en l'absence (à gauche) et en présence (à droite) de 0,1 équivalent de complexe paramagnétique $[Gd(DPA)_3]^{3-}$. Les signaux des résidus impliqués dans l'interaction (entourés en rouge dans le spectre de gauche) ont disparu du spectre de droite. Figure issue de ⁷⁷.

Le paramagnétisme des complexes de lanthanides rend possible l'exploitation des PCS et des PRE pour obtenir des informations sur le système observé : site d'interaction sur le partenaire du complexe (molécule de synthèse, peptide, protéine), structure spatiale, dynamique de l'interaction... Ces informations peuvent confirmer ou compléter celles obtenues par le biais

d'autres méthodes comme la mesure de diffusion par RMN (force de l'interaction, taille du système, dynamique).

6.2 MESURE DE DIFFUSION PAR RMN

La commercialisation dans les années 1990 de spectromètres RMN équipés de gradients de champs pulsés (PFG) performants de série a permis le développement des méthodes de mesure de diffusion par RMN.^{78, 79} Les séquences d'impulsions sont basées sur un écho de Spin (figure 22) et utilisent une paire de gradients selon l'axe Z pour réaliser un encodage spatial des signaux.^{78, 80} Le 1^{er} gradient de champ pulsé (PFG – Pulsed Field Gradient) déphase le signal à travers l'échantillon, et le 2nd le refocalise. Les 2 gradients de durée δ sont séparés par un délai de diffusion Δ pendant lequel les solutés diffusent dans l'échantillon.

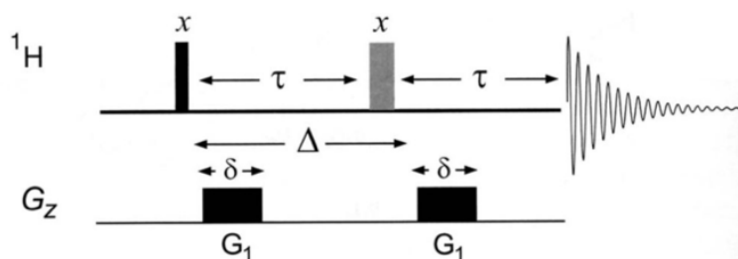


Figure 22 : séquence PGSE (Pulse Gradient Spin Echo). La paire de gradients G_1 permet un encodage spatial des signaux et l'écho de spin permet de refocaliser les déplacements chimiques.

Si une molécule a diffusé selon l'axe Z pendant ce délai son signal n'est pas complètement refocalisé : on observe une atténuation des signaux proportionnelle à la distance parcourue selon Z pendant le délai de diffusion. L'expérience est multidimensionnelle, des spectres sont enregistrés en augmentant l'intensité G du gradient, le coefficient de diffusion D du soluté est alors extrait de l'équation 4 qui relie l'intensité des signaux I et les paramètres expérimentaux :

$$I = I_0 \exp \left[-\gamma^2 \delta^2 G^2 \left(\Delta - \frac{\delta}{3} \right) D \right] \quad \text{Équation 11}$$

où I_0 est l'intensité des signaux avec un gradient nul et γ le rapport gyromagnétique du noyau observé. De nombreuses séquences d'impulsions dérivent de cette expérience PFGSE et proposent diverses pistes d'amélioration.⁸¹

Parmi ces méthodes, les expériences de DOSY (Diffusion Ordered SpectroscopY) représentent les données sous forme de cartes 2D avec un axe pour les déplacements chimiques et un axe pour les coefficients de diffusion D .^{81, 82} On parle parfois de « chromatographie par RMN » car les composants d'un mélange sont séparés selon leur coefficient de diffusion, qui reflète la mobilité des solutés, et donc plus indirectement leur taille et leur forme (figure 23).

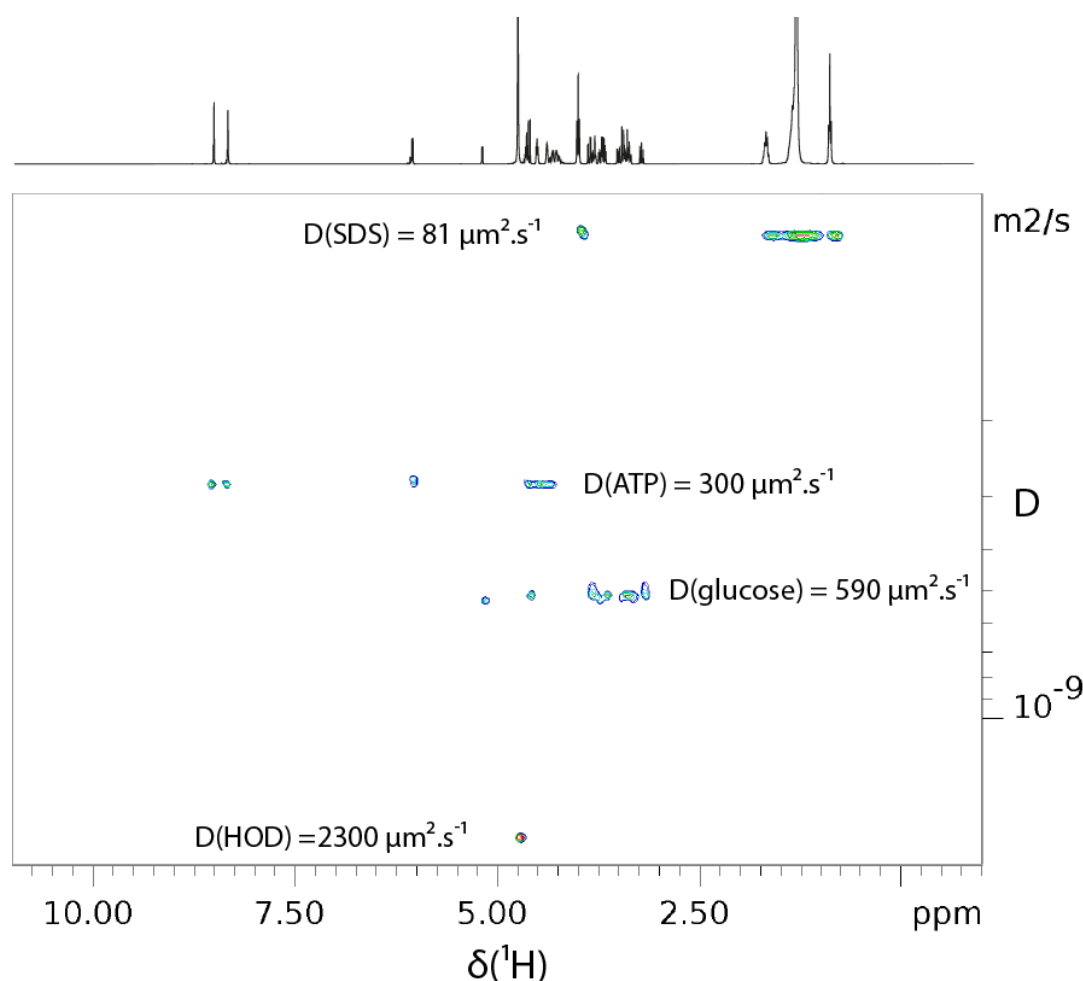


Figure 23 : spectre DOSY d'un mélange de glucose, ATP et micelles de SDS dans D_2O . Le spectre 1D 1H est montré en projection F2. L'axe F1 représente les coefficients de diffusion en $m^2.s^{-1}$ selon une échelle logarithmique.

La mesure de diffusion par RMN se montre par ailleurs très intéressante pour l'étude de systèmes dynamiques, qu'il s'agisse de systèmes supramoléculaires ou biologiques.¹⁰ La constante de dissociation K_d d'une interaction peut être déterminée à partir d'une titration^{63, 83}, et le coefficient de diffusion, reflétant la taille d'un complexe, peut confirmer la stœchiométrie de l'interaction⁸⁴ ou mettre en évidence un phénomène d'auto-association.⁸⁵ La RMN DOSY permet d'estimer la masse d'une espèce avec une précision variable selon la méthodologie utilisée : équation modèle⁸⁶, courbes de calibration,⁸⁷⁻⁸⁹ référence interne.⁹⁰ Cette technique peut être appliquée à l'étude de systèmes variés : paires d'ions, liquides ioniques, molécules encapsulées, protéine/ligand ...

6.3 MESURE DE DIFFUSION ET PARAMAGNÉTISME

La mesure de diffusion par RMN est une technique polyvalente qui peut apporter de nombreuses informations sur un système en interaction. Elle est applicable à l'étude de complexes de lanthanides paramagnétiques sous réserve de respecter certaines précautions

pour l'acquisition des données, en raison des temps de relaxation parfois très court des protons à proximité d'un centre paramagnétique.⁹¹ La plupart des études de diffusion par RMN de complexes de lanthanides sont basées sur l'utilisation d'ions diamagnétiques Lutecium (III), Lanthane (III) ou Yttrium (III).⁹²⁻⁹⁵ D'autres études utilisent des ions faiblement paramagnétiques comme l'Europium (III),⁹⁶⁻⁹⁸ le Samarium (III)⁹⁹ ou le Cerium (III).⁹³ En 2007 l'équipe de S.-L. Heath a étudié par RMN une série de complexes de lanthanides (avec Ln = Nd, Sm, Eu, Tb, Dy, Ho, Er ou Yb), en mesurant non seulement la diffusion des complexes d'Europium (III) et de Samarium (III) mais aussi celle du complexe de Neodymium (III).¹⁰⁰ Les coefficients de diffusion ont été déterminés avec une précision de 10% et les signaux RMN des complexes impliquant des ions fortement paramagnétiques se sont avérés trop larges pour qu'il soit possible de tirer des informations structurales des spectres DOSY. Ni la largeur des signaux ni la relaxation des protons observés ne sont cependant indiquées dans cette publication.

La mesure de diffusion semble limitée aux complexes de lanthanides diamagnétiques ou faiblement paramagnétiques. Cependant aucune étude publiée au début des travaux présentés ici ne définissait les limites de la technique de mesure de diffusion par RMN appliquée à des complexes paramagnétiques. Il semble donc intéressant d'évaluer l'impact du paramagnétisme sur la mesure de diffusion par RMN, en faisant varier l'ion lanthanide (III) dans une série de complexes, et de mesurer en parallèle la relaxation des noyaux dans les espèces observées.

6.4 MODÉLISATION MOLÉCULAIRE

La chimie théorique permet de décrire la géométrie et les propriétés physico-chimiques des molécules à partir d'une modélisation plus ou moins fine des énergies mises en jeu pour assurer leur cohésion, et leurs interactions avec leur environnement. Elle fournit des outils pour modéliser les structures de molécules, calculer des énergies ou des paramètres (spectroscopiques ...) qui pourront ensuite être comparés à l'expérience, ou encore simuler l'évolution de systèmes dynamiques. Ces techniques sont souvent utilisées en complément d'expériences de RMN. Les modèles théoriques peuvent intégrer les données RMN en tant que contraintes dans le calcul,¹⁰¹ ou comparer les données calculées avec les données expérimentales *a posteriori* afin de valider le modèle.¹⁰²

La Mécanique Moléculaire (MM) consiste à calculer la position dans l'espace des atomes qui constituent une molécule et l'énergie associée à cette structure, la structure la plus statistiquement représentative correspondant à une énergie la plus basse possible. La MM est basée sur des calculs de mécanique classique et utilise un ensemble de paramètres, appelé champ de force, qui représente la somme des forces qui apportent ou enlèvent de l'énergie au système (énergie de liaison, d'élongation, de torsion, électrostatique...). Une fois

la structure d'une molécule obtenue, on peut utiliser la Dynamique Moléculaire (MD) qui consiste à modéliser l'évolution d'un système au cours du temps. La position de chaque atome est calculée à tout moment en se basant sur un champ de force. Un outil souvent utilisé pour ce type de calculs avec des systèmes biologiques est appelé AMBER (Assisted Model Building and Energy Refinement). Il s'agit non seulement d'un champ de force mais aussi un ensemble d'outils spécialement adaptés aux calculs de Dynamique Moléculaire pour les protéines et les acides nucléiques.¹⁰³

Les méthodes dites « tout atome » sont adaptées à l'étude de systèmes comprenant jusqu'à 100000 atomes et sur des durées de simulation allant jusqu'à la microseconde.

La Mécanique Quantique (MQ) donne des résultats plus précis que les méthodes « tout atome » mais nécessite des ressources plus importantes (puissance de calcul) et les durées de simulation sont de l'ordre de la picoseconde au maximum. Elle est donc en général réservée à l'étude de petites molécules (moins de 300 atomes). Certaines méthodes de MQ utilisent des approximations et demandent donc moins de calculs, c'est le cas de la méthode de la fonctionnelle de densité (DFT) qui calcule l'énergie du système à partir de la densité au lieu des orbitales moléculaires. La DFT peut aussi être utilisée pour calculer des paramètres RMN (déplacements chimiques ou constantes de couplage scalaire).

6.5 SYSTÈMES IMPLIQUANT UN COMPLEXE DE LANTHANIDE PARAMAGNÉTIQUE

Les systèmes étudiés dans le cadre de ces travaux de thèse impliquent tous un complexe de lanthanide paramagnétique : un complexe de tris-dipicolinate $[\text{Ln}(\text{DPA})_3]^{3-}$ dans les chapitres II, III et IV et un complexe de tris-hexafluoroacetylacetonate $[\text{Ln}(\text{hfac})_3]$ dans le chapitre V.

Outre une caractérisation classique par RMN 1D ^1H (accompagnée de spectres 2D COSY, TOCSY ou HSQC), la diffusion de ces systèmes est analysée afin de vérifier la taille de l'adduit (nombre de partenaires en interaction) et la force de l'interaction (détermination de K_d).

Dans un 1^{er} temps la méthode de mesure de diffusion par RMN est optimisée sur des systèmes simples $[\text{A}]_3[\text{Ln}(\text{DPA})_3]$ (avec $\text{A} = \text{Na}^+$ ou ethylguanidium), ce qui permet d'estimer l'incertitude expérimentale et d'évaluer l'influence du paramagnétisme du lanthanide sur la mesure de diffusion.

La méthode est alors appliquée à des systèmes biologiques : (i) l'étude d'une interaction $[\text{Ln}(\text{DPA})_3]^{3-}$ - protéine permet d'obtenir une valeur de K_d qui est validée par comparaison avec les résultats issus d'une étude RMN plus classique (ii) l'analyse d'une interaction $[\text{Ln}(\text{DPA})_3]^{3-}$ - decapeptide s'avère plus compliquée et nécessite une étude combinée par RMN paramagnétique et MM pour valider le mode d'interaction (figure 24).

Enfin la méthode est appliquée par le biais d'une collaboration avec le groupe du Dr. Fabrice Pointillart (Université de Rennes) pour caractériser la nucléarité en solution d'un système à base de lanthanide paramagnétique $[\text{Ln}(\text{hfac})_3]$ présentant des propriétés magnétiques intéressantes. Bien que ce système soit un polymère de coordination à l'état solide, l'étude de la diffusion par RMN combinée avec des résultats de MM, montre qu'il existe sous forme de monomère en solution.

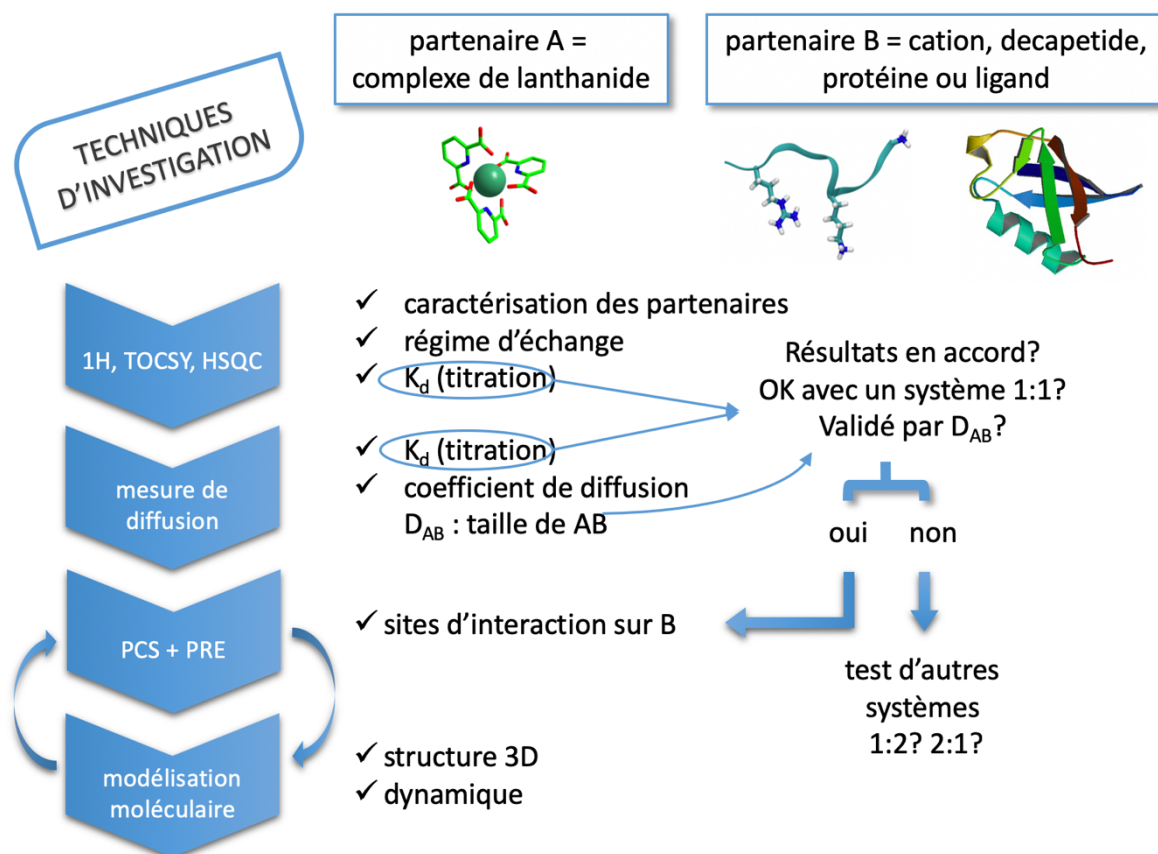


Figure 24 : méthode appliquée dans ces travaux de thèse pour étudier une interaction impliquant un complexe de lanthanide paramagnétique. A chaque étape les données enregistrées sur les partenaires A et B à l'état libre et sur l'adduit AB sont comparées.

II - MÉTHODOLOGIE

La mesure de diffusion par RMN semble intéressante pour l'analyse en solution de systèmes en interaction. Cette technique a rarement été appliquée à l'étude de systèmes paramagnétiques. Les temps de relaxation T_1 des noyaux proches d'un centre paramagnétique peuvent être significativement diminués, et une relaxation trop rapide pourrait impacter, voire même empêcher la mesure de diffusion par RMN.

Le protocole de mesure de diffusion est donc testé sur un système simple, déjà étudié dans notre équipe, impliquant un complexe de tris-dipicolinate et un ion (sodium ou ethylguanidium), afin d'étudier l'influence du paramagnétisme sur la mesure. Avant cela le protocole est optimisé sur un système diamagnétique, et la précision expérimentale est estimée. Une référence interne (1,4-dioxane) est ajoutée aux échantillons, les rapports de diffusion (D/D_{ref}) permettant de comparer les propriétés de divers systèmes en prenant en compte les différences liées à la viscosité de l'échantillon (variations de concentration, salinité, température...).

1 - MESURE ET PRÉCISION

1.1 MESURE DE DIFFUSION PAR RMN : CHOIX DE LA SÉQUENCE

Une séquence standard de type BPP LED (Bipolar Pulse Pair Longitudinal Eddy current Delay) a été choisie pour notre protocole de mesure (figure 25).¹⁰⁴ Dans la séquence de base PFGSE l'aimantation est transverse pendant le délai de diffusion, l'intensité des signaux est affectée par la relaxation transverse. Remplacer l'impulsion 180° de l'écho de spin par 2 impulsions 90° permet de s'affranchir de ce problème. L'ajout d'un bloc composé de 2 impulsions 90° séparées par un délai T_e permet de garder l'aimantation selon z pendant T_e et de diminuer les courants de Foucault induits par les gradients. Ces courants électriques créent des champs magnétiques locaux qui dégradent l'homogénéité du champ principal et peuvent affecter la phase des signaux. En outre, chaque gradient est remplacé par une paire de gradients de même intensité et de signes opposés, ces-derniers étant séparés par un pulse 180° qui permet de diminuer un peu plus les courants de Foucault.

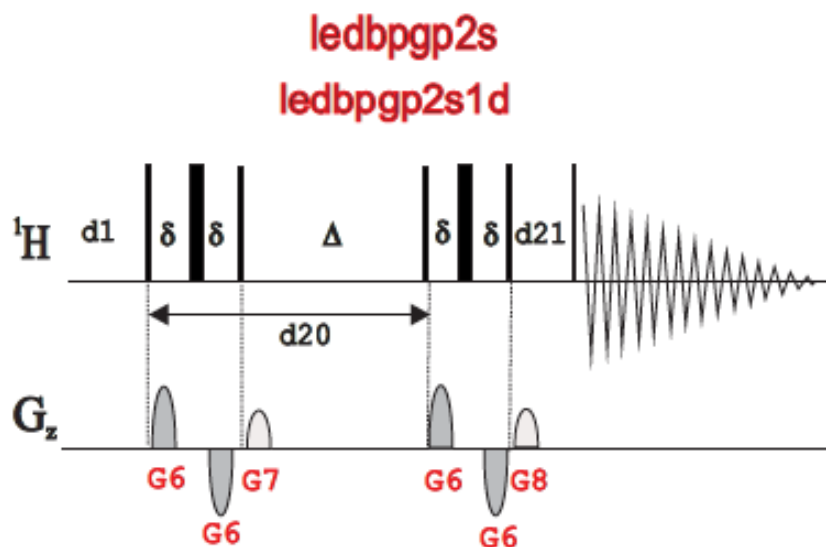


Figure 25: séquence BPP LED issue de la bibliothèque de programmes Bruker. L'encodage est assuré par 2 paires de gradients d'intensité G6 séparés par une impulsion 180° . Les 2^{ème} et 3^{ème} impulsions 90° constituent l'écho de spin. Le bloc LED est composé des 4^{ème} et 5^{ème} impulsions 90° séparées par le délai d21. d20 est le délai de diffusion. G7 et G8 sont des gradients de purge.

1.2 EXPÉRIENCES PRÉLIMINAIRES

Les expériences PGSE se montrent robustes par rapport à la plupart des paramètres expérimentaux, tels que le délai de relaxation ou la durée des impulsions.¹⁰⁵ Avec un spectromètre moderne, la qualité des données dépend essentiellement (i) de la linéarité des gradients, (ii) de l'absence de convection, et donc de la stabilité de la température dans l'échantillon, et (iii) de la stabilité du lock durant l'acquisition.^{106, 107}

La calibration des gradients est vérifiée au préalable en mesurant la diffusion d'un échantillon d'eau deutérée.^{106, 108} Dans un second temps un échantillon composé de sodium dodecyl sulfate (SDS), d'adenosine 5'-triphosphate (ATP) et de D-glucose (tous à 0,1 M dans D₂O) permet de vérifier la calibration des gradients pour une large gamme de coefficients de diffusion.^{106, 109}

Le système : $[A]_3[Ln(DPA)_3]$, A étant un cation, a été étudié précédemment dans notre équipe.^{27, 29, 64, 66} Le complexe diamagnétique $[Na]_3[Lu(DPA)_3]$ en solution ($c = 10$ mM dans D₂O) a été choisi comme système modèle pour tester la robustesse du protocole de mesure. Une référence interne de diffusion est ajoutée à l'échantillon.¹¹⁰ Le 1,4-dioxane est sélectionné en tant que référence, cette molécule est soluble dans l'eau dans une gamme de concentration adéquate, elle ne semble pas pouvoir interagir avec les composants de notre échantillon et son spectre RMN 1H consiste en un singulet unique (figure 26).^{111, 112} Ainsi, le coefficient de diffusion du dioxane reflète les variations liées au milieu (salinité de la solution,

viscosité, température) et les rapports de diffusion $R = D/D_{\text{ref}}$ (où $D_{\text{ref}} = D_{\text{dioxane}}$) permettent de s'affranchir de ces paramètres et d'observer les variations de diffusion liées uniquement aux phénomènes d'interaction.

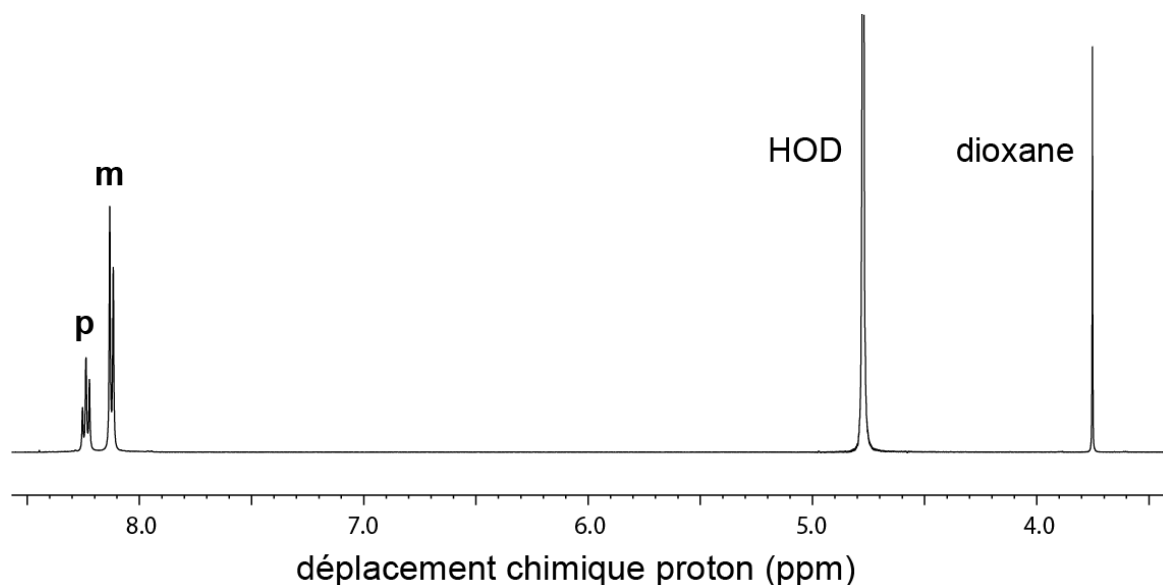


Figure 26 : spectre RMN ^1H de $[\text{Na}]_3[\text{Lu}(\text{DPA})_3]$ ($c = 10 \text{ mM}$) dans D_2O en présence de 1,4-dioxane ($c = 5 \text{ mM}$).

Les mesures de diffusion ont été effectuées avec un délai de diffusion $\Delta = 150 \text{ ms}$, des gradients d'une durée $\delta = 1 \text{ ms}$ et une intensité augmentant de façon linéaire de 0,96 à 45,76 G.cm^{-1} en 40 points. Ces paramètres permettent d'obtenir des courbes de diffusion satisfaisantes (figure 27). 48 scans donnent un bon rapport signal/bruit. Les intégrales des signaux sont utilisées pour le calcul.

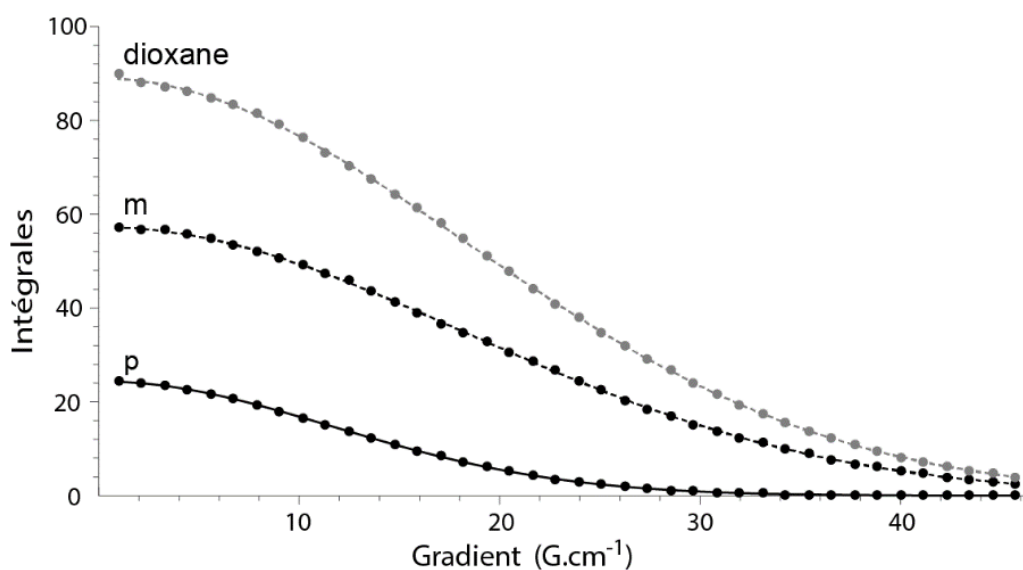


Figure 27: évolution des intégrales des signaux en fonction de la force du gradient G pour les protons aromatiques **m** et **p** du complexe de Lutécium $[\text{Na}]_3[\text{Lu}(\text{DPA})_3]$ (en noir) et pour le 1,4-dioxane (en gris). Les tracés en pointillés représentent l'ajustement des points expérimentaux par les courbes théoriques modélisées par l'équation 11.

La valeur la plus probable du coefficient de diffusion D est déterminée par régression non linéaire. L'équation 11 est utilisée pour simuler des courbes qui sont ajustées à la courbe expérimentale $I = f(G)$, en cherchant à minimiser l'écart entre courbe simulée et expérimentale (principe des moindres carrés). L'incertitude $u(D)$ sur ce calcul est ensuite estimée de la façon suivante : d'abord l'écart type moyen σ entre les points expérimentaux et les points du meilleur ajustement est calculé comme indiqué dans l'équation 12.

$$\sigma = \frac{1}{\sqrt{n}} \sqrt{C} \text{ avec } C = \sum_i^n \left[\frac{I_i^{fit}}{I_0} - \frac{I_i^{exp}}{I_0} \right]^2 \quad \text{Équation 12}$$

où C est la quantité minimale de moindres carrés pour n points expérimentaux. Cette équation est valable si le niveau de bruit expérimental est le même pour tous les points expérimentaux et si n est suffisamment grand. Le coefficient de diffusion D est supposé être la valeur centrale d'une distribution gaussienne avec un écart-type σ . Un ensemble de 1000 courbes est généré par simulation Monte Carlo, chaque point est généré avec une erreur choisie aléatoirement dans l'intervalle $[-\sigma, \sigma]$. Ensuite, chacune des 1000 courbes simulées est ajustée à l'équation 12 et un coefficient de diffusion D_i est obtenu. Enfin, l'incertitude $u(D)$ est calculée à partir de cet ensemble de valeurs en utilisant la relation suivante

$$u(D) = \frac{\sqrt{\sum_i (D_i - D_{fit})^2}}{n} \quad \text{Équation 13}$$

Une incertitude $u(D) = 0,62 \cdot 10^{-12} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ est calculée pour le doublet de $[\text{Na}]_3[\text{Lu}(\text{DPA})_3]$, ce qui correspond à une incertitude relative $u(D)/D < 0,2\%$ (figure 28). Le résultat $D = 348,11 \pm 0,62 \cdot 10^{-12} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ montre une grande précision mais ne donne pas d'information sur l'exactitude de la méthode, une hypothèse de départ ayant été faite sur l'absence d'erreur systématique. Cette hypothèse est confirmée par le résultat pour le deuxième signal de $[\text{Na}]_3[\text{Lu}(\text{DPA})_3]$. Le coefficient de diffusion calculé pour le triplet est $D = 349,36 \pm 0,67 \cdot 10^{-12} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ ce qui est en accord avec la valeur précédente.

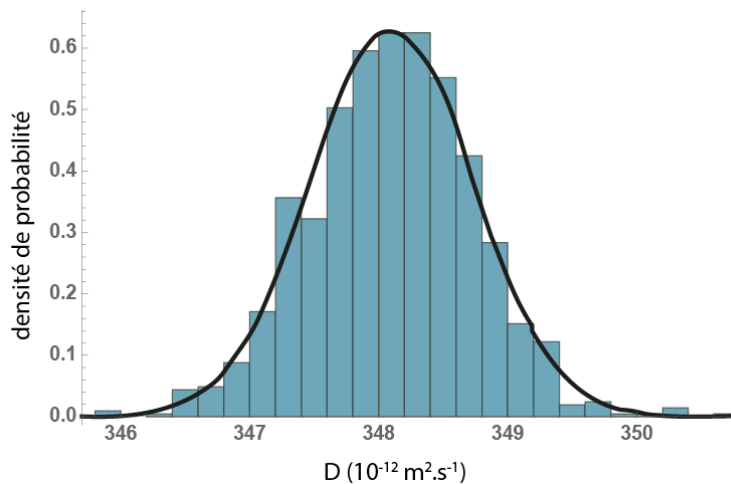


Figure 28: distribution calculée par une simulation de Monte-Carlo pour le coefficient de diffusion : $D = 348,11 \pm 0,62 \cdot 10^{-12} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$

La précision de la méthode doit être confirmée par une étude de reproductibilité, tandis que l'exactitude peut être vérifiée par l'acquisition d'une série d'expériences où une erreur systématique est introduite via un paramètre d'acquisition non optimisé. Ces variations dans les conditions expérimentales devraient permettre d'identifier un biais potentiel affectant la mesure de diffusion.

1.3 PRÉCISION DE LA MESURE

Avec un spectromètre moderne il est possible d'atteindre une précision de 1% sur la détermination de D pour des expériences de diffusion classique.^{113, 114} Afin de prendre en compte les variations dues à l'instabilité du spectromètre (variations de température dans la salle RMN, variation du débit d'air comprimé affectant la régulation de température dans la sonde...), une étude de répétabilité est mise en œuvre. La mesure est répétée, avec le même échantillon, sur une période de 5 mois, et 22 expériences sont prises en compte dans l'étude statistique. Les coefficients de diffusion des protons **m** et **p** du complexe de Lutécium sont déterminés pour chaque mesure, ce qui donne 44 coefficients de diffusion au total. Une analyse statistique classique de ces données (tableau 1) donne une valeur moyenne $D = 347,7 \cdot 10^{-12} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$. La distribution de ces données suit une loi normale avec un écart-type relatif $\sigma(D)/D = 0,7\%$ (figure 29).

expérience	$D(\text{dioxane})$	$D(\text{m DPA})$	$D(\text{p DPA})$
1	867,9	349,1	353,7
2	867,7	348,1	349,3
3	866,2	349,0	348,0
4	864,3	350,1	345,5
5	866,1	347,9	346,3
6	863,5	347,1	349,3
7	860,8	344,3	350,5
8	858,1	347,8	346,4
9	863,5	349,5	342,8
10	859,3	347,6	345,6
11	860,0	346,2	346,6
12	860,0	345,9	347,6
13	861,6	346,9	347,5
14	861,1	348,2	346,2
15	862,7	351,3	343,3
16	859,1	349,9	344,3
17	864,0	349,3	347,7
18	860,8	348,3	347,6
19	860,0	345,9	350,2
20	867,2	352,2	343,0
21	854,9	345,4	351,0
22	857,8	348,1	347,6

Tableau 1: coefficients de diffusion D (en $10^{-12} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$) déterminés pour les signaux du 1,4-dioxane et du complexe $[\text{Na}]_3[\text{Lu}(\text{DPA})_3]$. La mesure a été répétée 22 fois.

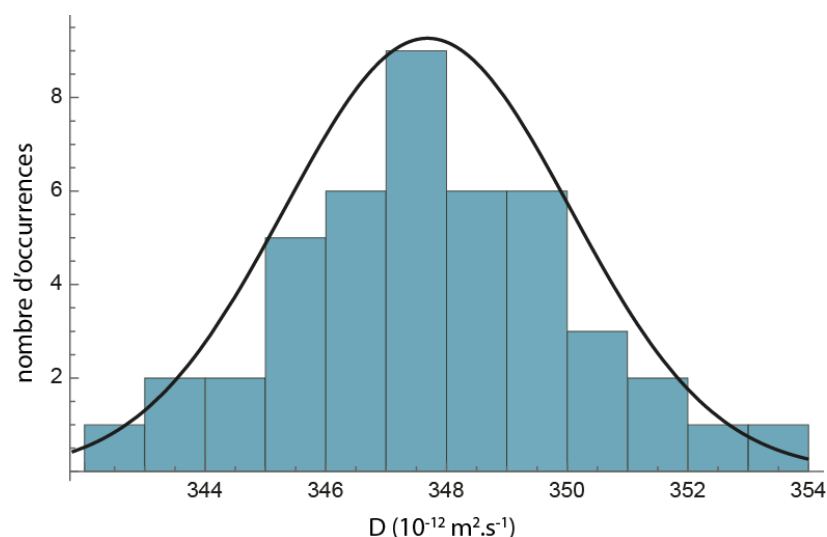


Figure 29: distribution des 44 coefficients de diffusion mesurés pour $[\text{Na}]_3[\text{Lu}(\text{DPA})_3]$ sur une période de 5 mois. La gaussienne qui représente le mieux les données est définie par une valeur moyenne $D = 347,7 \cdot 10^{-12} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ et un écart-type $\sigma = 2,4 \cdot 10^{-12} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$.

La précision de la mesure a été calculée par une simulation de Monte-Carlo, puis vérifiée expérimentalement par une étude de reproductibilité. La précision est maintenant estimée sur les rapports de diffusion $R = D/D_{ref}$, avec D_{ref} le coefficient de diffusion d'une référence interne (ici le 1,4-dioxane).

En effet nous prévoyons de comparer les propriétés de diffusion d'espèces dans des milieux variables. L'utilisation de R permet de s'affranchir des variations de température ou de viscosité, ces paramètres affectant de manière similaire la diffusion de la molécule observée et celle de la référence. Il est alors possible de comparer la diffusion d'échantillons de concentration différente, comme dans le cas d'une titration ou d'une étude d'interactions intermoléculaires.

Les rapports de diffusion R sont donc soumis à la même analyse statistique. R est estimé à 0,403 avec un écart-type relatif $\sigma(R)/R = 0,7\%$ (figure 30).

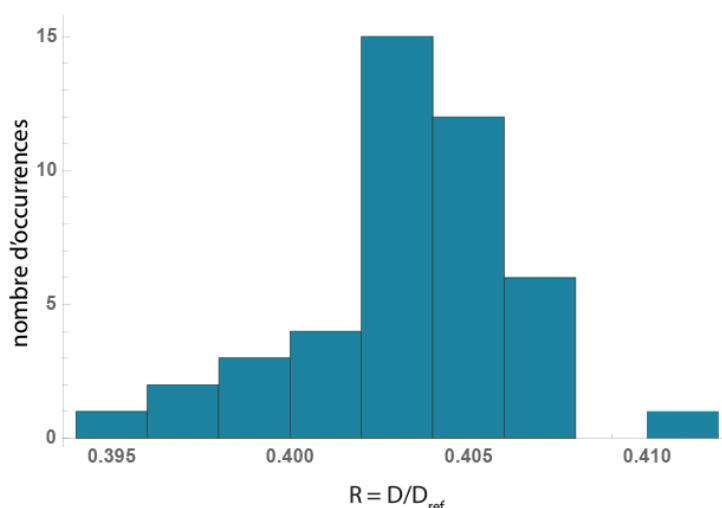


Figure 30: distribution des 44 rapports de diffusion mesurés pour $[Na]_3[Lu(DPA)_3]$ avec le 1,4-dioxane comme référence. R est estimé à 0,403 avec un écart type $\sigma = 0,003$.

Le rapport R utilise 2 valeurs expérimentales (D et D_{ref}), chacune associée à sa propre incertitude expérimentale : l'écart-type $\sigma(R)$ ne reflète donc pas de façon rigoureuse l'incertitude associée à R . L'incertitude expérimentale $u(R)$ est déterminée par une méthode basée sur la loi de propagation des incertitudes qui prend en compte les incertitudes des 2 mesures D et D_{ref} :

$$u^2(R) = \left(\frac{\partial R}{\partial D}\right)^2 u^2(D) + \left(\frac{\partial R}{\partial D_{ref}}\right)^2 u^2(D_{ref}) + 2 \left(\frac{\partial R}{\partial D}\right) \left(\frac{\partial R}{\partial D_{ref}}\right) u(D, D_{ref}) \quad \text{Équation 14}$$

Dans le cas où les variables D et D_{ref} sont indépendantes l'équation 14 peut être simplifiée en équation 15.

$$u(R) = \sqrt{\frac{(\overline{D_{ref}})^2 (\sigma_D)^2 + (\overline{D}) (\sigma_{ref})^2}{(\overline{D_{ref}})^4}} \quad \text{Équation 15}$$

où $\bar{D}$ et $\overline{D_{ref}}$ sont les valeurs moyennes de D et D_{ref} et σ_D et σ_{ref} les valeurs respectives d'écart type. Une valeur $u(R) = 0,005$ est calculée par cette méthode, ce qui correspond à une incertitude relative $u(R)/R = 1,2\%$. Cette valeur est légèrement supérieure à l'écart type déterminé par l'analyse statistique $\sigma(R)/R = 0,7\%$, ce qui suggère une covariance négative entre D et D_{ref} .

Pour la suite de cette étude l'incertitude relative sera estimée à 1% en accord avec ces résultats et ceux trouvés dans la littérature.^{113, 114} L'étude de répétabilité ne sera pas réitérée systématiquement mais chaque mesure sera toutefois répétée 3 fois afin de s'assurer de l'absence de biais. Chaque rapport R sera exprimé sous la forme $R = R_{moy} \pm u(R)$ avec R_{moy} la moyenne des 3 valeurs de R mesurées expérimentalement et $u(R) = 1\%$ de R_{moy} .

1.4 ROBUSTESSE DE LA MESURE

Les valeurs d'incertitude mesurées jusqu'ici sont dépendantes de la stabilité du spectromètre, il est indispensable de maîtriser l'environnement de l'appareil et de s'assurer de la stabilité du lock et de la température de l'échantillon pour atteindre une telle précision. Un défaut de phase du lock de 20 degrés provoque une distorsion des signaux intenses lors d'une expérience PGSE et peut affecter la précision de la mesure (figure 31). Des vibrations du sol (causées par des travaux à moins de 10 mètres de la salle RMN), une pression en air comprimé instable, une panne de climatisation ont aussi été identifiés comme des facteurs affectant la qualité des données RMN.

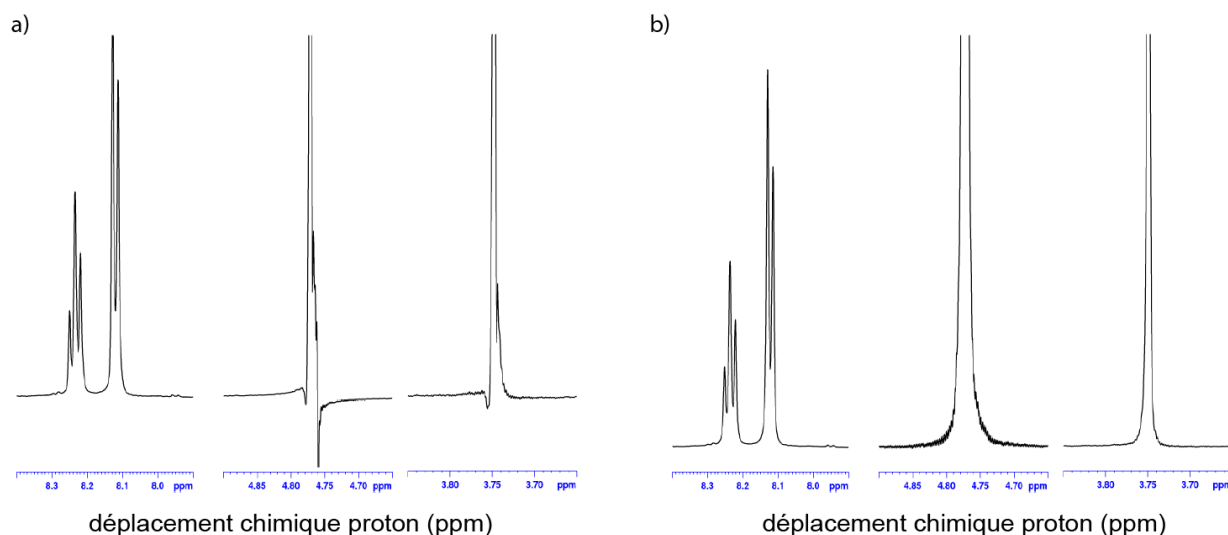


Figure 31: effet d'un mauvais réglage de la phase du lock sur une mesure de diffusion. a) la phase du lock est incorrecte, environ 20 degrés d'erreur. b) la phase du lock est correcte. Les spectres correspondent au premier point de la mesure, avec une valeur de gradient $G = 0,963 \text{ G.cm}^{-1}$, les paramètres d'acquisition sont dans les 2 cas ceux utilisés pour l'étude de répétabilité ($\Delta = 150 \text{ ms}$, $\delta = 1 \text{ ms}$, $D1 = 1 \text{ s}$).

La robustesse de la mesure par rapport à certains paramètres est ensuite vérifiée. L'acquisition d'une série d'expériences où une erreur systématique est introduite via un paramètre d'acquisition non optimisé permet de tester l'exactitude de la mesure. Ces variations des conditions expérimentales devraient permettre d'identifier un biais potentiel affectant la mesure de diffusion. Les paramètres testés sont le nombre de points de la mesure (TD1), le délai de relaxation (D1), le délai de diffusion (Δ), le nombre de scans (NS) et la gamme d'intensité du gradient (G) (tableau 2).

<i>expérience</i>	<i>D(dioxane)</i>	<i>D(m DPA)</i>	<i>D(p DPA)</i>	<i>paramètre modifié</i>
1	875,5	349,5	349,1	TD1 = 10 points
2	851,0	347,3	345,0	TD1 = 10 points
3	866,0	346,0	346,0	TD1 = 10 points
4	860,6	344,6	342,2	NS = 8
5	866,8	339,4	340,7	NS = 8
6	857,0	341,1	343,5	NS = 8
7	865,2	351,0	345,8	Δ = 50ms
8	855,4	348,8	340,4	Δ = 50ms
9	854,1	345,3	346,7	Δ = 50ms
10	867,5	352,2	348,1	G = 0,48 - 14,45 G.cm ⁻¹
11	854,8	347,6	343,4	G = 0,48 - 14,45 G.cm ⁻¹
12	849,8	337,8	352,3	G = 0,48 - 14,45 G.cm ⁻¹
13	871,2	349,2	349,9	D1= 0,2s
14	859,4	342,3	345,7	D1= 0,2s
15	872,6	348,2	348,4	D1= 0,2s

Tableau 2 : coefficients de diffusion D (en $10^{-12} \text{ m}^2.\text{s}^{-1}$) déterminés pour les signaux du 1,4-dioxane et du complexe $[\text{Na}]_3[\text{Lu}(\text{DPA})_3]$. La mesure a été répétée 3 fois pour chaque modification d'un paramètre.

Le rapport signal/bruit (S/B) semble être un paramètre primordial pour ce type de mesure : l'intensité des signaux décroît avec l'augmentation du gradient appliqué et S/B peut décroître rapidement lui aussi et affecter la précision expérimentale. On peut voir ici qu'un faible nombre de scans a pour conséquence de sous-estimer légèrement la mesure de diffusion ($R = 0,3969 \pm 0,0038$). Cependant la concentration de l'échantillon étudié est telle que S/B reste supérieur à 500 au 20^{ème} point (sur 40) de la mesure. Le cyclage de phase impose 8 scans au minimum, il nous est donc impossible à cette concentration de tester réellement l'effet du S/B sur la précision expérimentale.

Une simulation de Monte-Carlo est alors utilisée pour simuler l'influence de la sensibilité de l'expérience (mesurée par le rapport S/B) sur la précision de la mesure de diffusion (figure 32). Pour les espèces diffusant rapidement ($D > 500 \cdot 10^{-12} \text{ m}^2.\text{s}^{-1}$) l'erreur reste faible ($< 2\%$) même dans le cas d'un S/B médiocre. Pour des espèces diffusant plus lentement (D entre 500 et $100 \cdot 10^{-12} \text{ m}^2.\text{s}^{-1}$) un S/B insuffisant (< 100) augmente l'erreur expérimentale de façon

significative à plus de 5%. Un S/B supérieur à 1000 semble garantir une mesure précise (moins de 1% d'erreur) quelle que soit la diffusion de l'espèce observée, à la condition que les autres sources d'erreurs soient maîtrisées.¹¹⁵

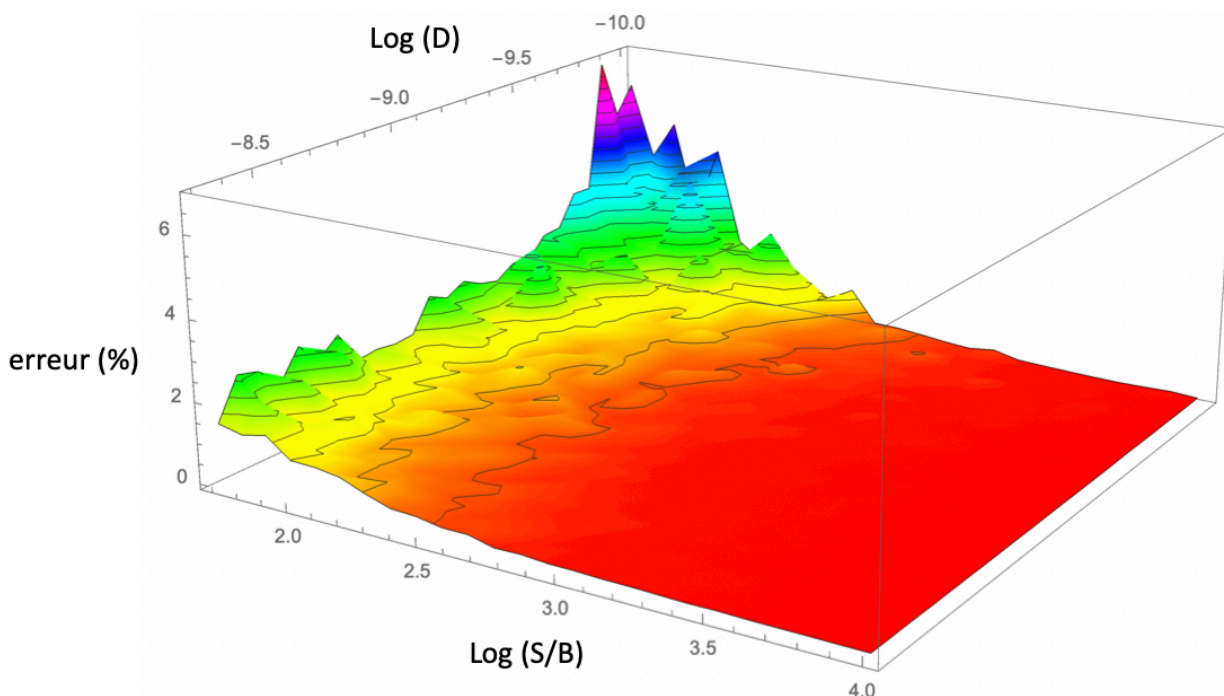


Figure 32 : effet du rapport signal/bruit (S/B) sur l'erreur expérimentale d'une mesure de diffusion (D , en $\text{m}^2.\text{s}^{-1}$). L'erreur (%) correspond à la déviation standard déterminée par une analyse d'erreur de type Monte Carlo des courbes de diffusion simulées pour chaque valeur de coefficient de diffusion, affectées d'une erreur expérimentale S/B.

Un nombre de scans insuffisant peut donc affecter l'exactitude la mesure. En outre, si la courbe $I/I_0 = f(G)$ est incomplète du fait d'un mauvais échantillonnage de la force du gradient G , alors c'est la précision de la mesure qui est dégradée ($R = 0,4046 \pm 0,0059$). Cependant ces variations restent faibles et la mesure de diffusion par RMN s'avère robuste (figure 33). Les distributions représentées ne permettent pas de dire si elles suivent une loi normale comme c'était le cas lors de l'étude de répétabilité précédente. Seulement 6 valeurs de R sont utilisées pour illustrer chaque modification de paramètre, ce qui est insuffisant pour une étude statistique rigoureuse mais permet toutefois de montrer une tendance.

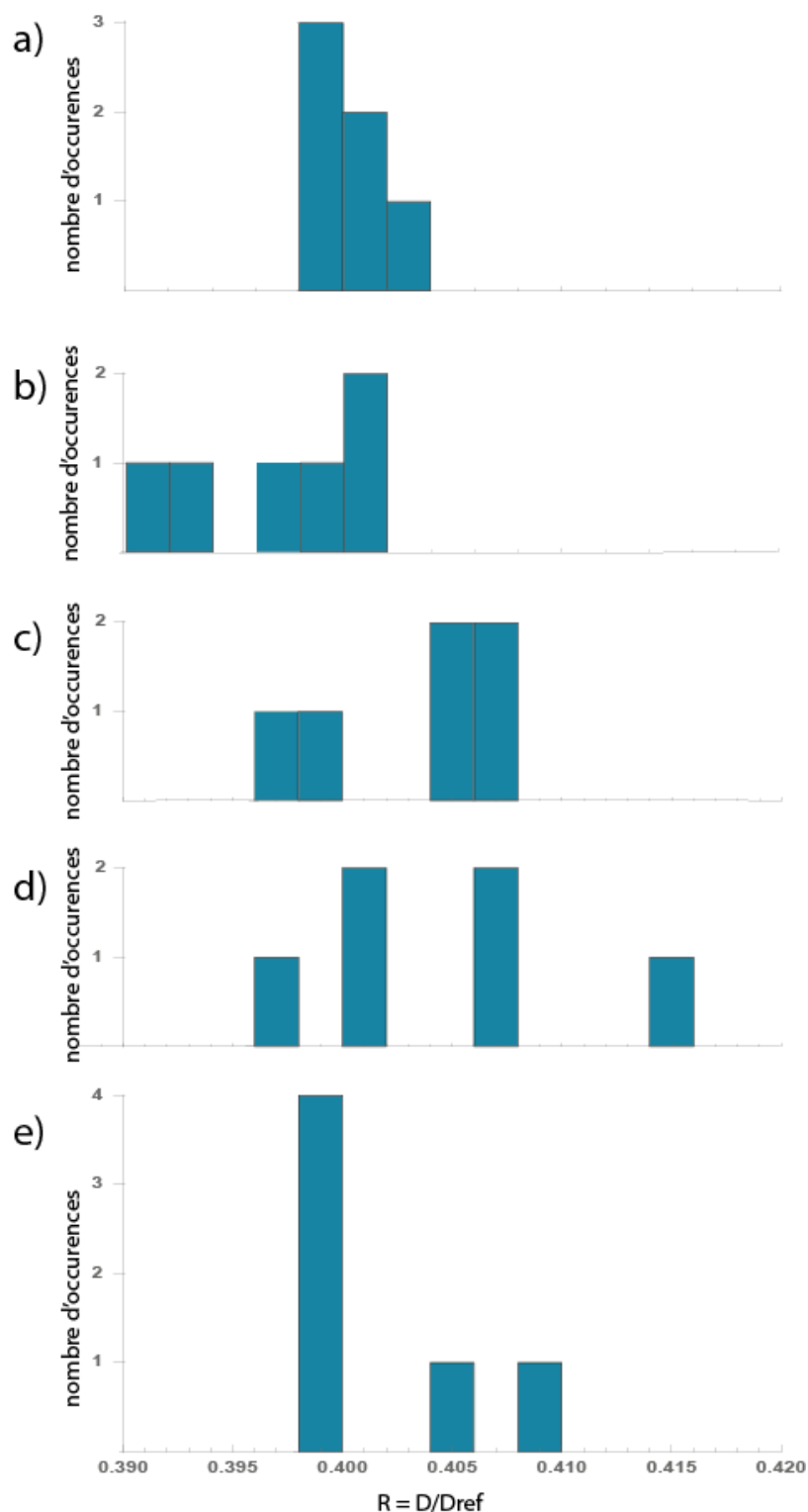


Figure 33 : effet de la dégradation d'un paramètre d'acquisition sur la distribution des rapports de diffusion R mesurés pour $[Na]_3[Lu(DPA)_3]$ avec le 1,4-dioxane comme référence. Les paramètres modifiés sont a) $D1 = 0,2$ s b) $NS = 8$ c) $\Delta = 50$ ms d) G entre 0,48 et 14,45 $G \cdot cm^{-1}$ e) $TD1 = 10$ points. Les valeurs optimales sont $D1 = 1$ s, $NS = 48$, $\Delta = 150$ ms, G de 0,96 à 45,76 $G \cdot cm^{-1}$ et $TD1 = 40$.

La méthode de mesure de diffusion choisie a été testée sur un échantillon $[\text{Na}]_3[\text{Lu}(\text{DPA})_3]$. La précision expérimentale a été calculée puis vérifiée expérimentalement. La robustesse de la mesure par rapport à certains paramètres a été ensuite validée. Une incertitude relative de 1% est retenue comme valeur standard pour des mesures de diffusion réalisées sur un spectromètre préalablement calibré, avec une température correctement réglée et un lock stable et juste (attention à vérifier la phase du lock). Les paramètres d'acquisition doivent être choisis de façon à obtenir une courbe de diffusion échantillonnée jusqu'à $I/I_0 = 0,05$ et le nombre de scans doit permettre un $S/B > 1000$. Ces conditions sont valables pour un système diamagnétique, et doivent être maintenant vérifiées avec un échantillon paramagnétique.

2 - INFLUENCE DU PARAMAGNÉTISME

Le protocole de mesure de diffusion est maintenant optimisé pour l'échantillon diamagnétique $[\text{Na}]_3[\text{Lu}(\text{DPA})_3]$, les sources d'erreur principales sont identifiées et l'incertitude expérimentale est estimée à 1%. Cependant la plupart des ions Lanthanides sont paramagnétiques.⁶² Les temps de relaxation T_1 des noyaux proches d'un centre paramagnétique peuvent être significativement diminués, et une relaxation trop rapide pourrait impacter, voire même empêcher la mesure de diffusion par RMN. Il est donc intéressant d'évaluer maintenant l'impact du paramagnétisme sur la mesure de diffusion par RMN.

La série des complexes de tris-dipicolinates $[\text{Ln}(\text{DPA})_3]^{3-}$ est homogène et isostructurale, quel que soit l'ion lanthanide : il est ainsi possible d'isoler la contribution de l'ion central et d'étudier l'impact du paramagnétisme sur la mesure de diffusion par RMN. Tout d'abord, un système modérément paramagnétique $[\text{Na}]_3[\text{Yb}(\text{DPA})_3]$ sera étudié et la précision de la mesure sera vérifiée. Puis une série de complexes $[\text{EtGua}]_3[\text{Ln}(\text{DPA})_3]$ plus ou moins paramagnétiques (déjà étudiés par RMN ^1H précédemment dans l'équipe) sera testée.

2.1 PRÉCISION DE LA MESURE AVEC UN SYSTÈME PARAMAGNÉTIQUE

Dans un premier temps l'étude de répétabilité est reproduite avec un échantillon $[\text{Na}]_3[\text{Yb}(\text{DPA})_3]$ (figure 34). L'Ytterbium (III) est choisi pour son paramagnétisme modéré.⁶² Les signaux des protons **m** et **p** sont élargis sous l'effet du paramagnétisme (environ 15 Hz à mi-hauteur) mais leur relaxation longitudinale (T_1 de respectivement 79 et 174 ms) est a priori assez lente pour ne perturber la mesure de diffusion. Leurs déplacements chimiques sont faiblement décalés par rapport à ceux du système diamagnétique $[\text{Na}]_3[\text{Lu}(\text{DPA})_3]$.

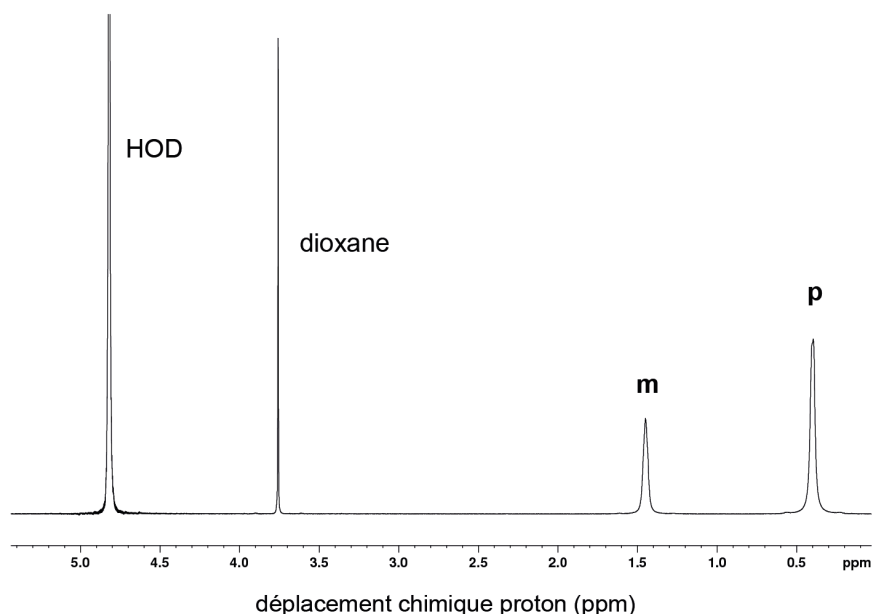


Figure 34 : spectre RMN ^1H de $[\text{Na}]_3[\text{Yb}(\text{DPA})_3]$ ($c = 10 \text{ mM}$) dans D_2O , en présence de 1,4-dioxane ($c = 5 \text{ mM}$).

Comme précédemment la mesure est répétée, avec le même échantillon et 22 expériences sont prises en compte dans l'étude statistique. Les paramètres expérimentaux (Δ , δ , G , TD1 , D1 , NS) sont inchangés. Les coefficients de diffusion des protons **m** et **p** du complexe d'Ytterbium sont déterminés pour chaque expérience, ce qui donne 44 coefficients de diffusion au total. Les rapports de diffusion $R = D/D_{\text{ref}}$ sont soumis à une analyse statistique. La valeur moyenne de $R = 0,402 \pm 0,003$ pour ce système paramagnétique est similaire à la valeur calculée pour le système diamagnétique $[\text{Na}]_3[\text{Lu}(\text{DPA})_3]$ ($R = 0,403 \pm 0,003$) et la distribution de ces données suit encore une fois une loi normale avec un écart-type relatif $\sigma(R)/R < 1\%$ (figure 35).

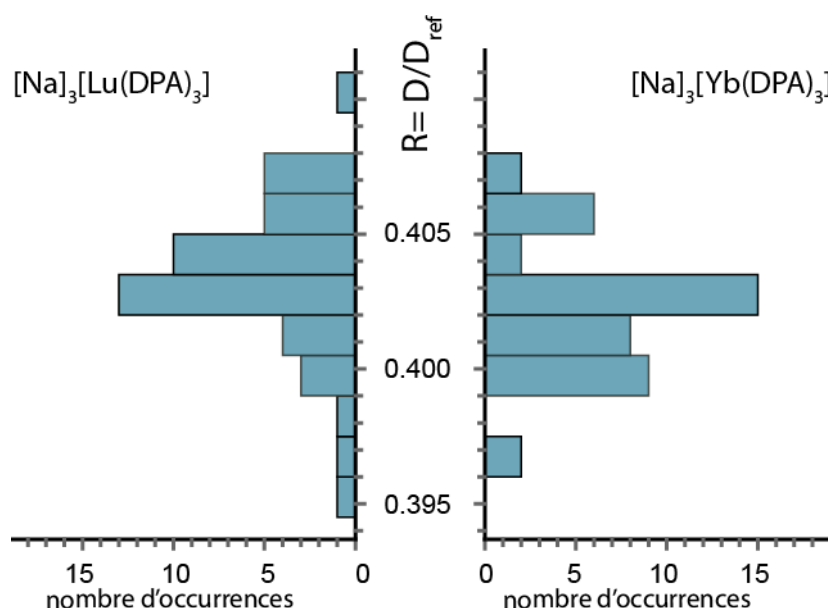


Figure 35 : distribution des rapports de diffusion mesurés pour les systèmes $[\text{Na}]_3[\text{Lu}(\text{DPA})_3]$ diamagnétique (à gauche) et $[\text{Na}]_3[\text{Yb}(\text{DPA})_3]$ paramagnétique (à droite) avec le 1,4-dioxane comme référence. R est estimé respectivement à 0,403 et 0,402.

Il est donc possible de mesurer des coefficients de diffusion pour un échantillon modérément paramagnétique avec une précision similaire à celle attendue pour son équivalent diamagnétique, pourvu que les paramètres importants de l'expérience soient maîtrisés (spectromètre préalablement calibré, une température correctement régulée et un lock stable et juste). Cependant de nombreux lanthanides présentent un paramagnétisme plus fort que l'Ytterbium (III). La mesure de diffusion est donc testée sur un complexe de Terbium (III) fortement paramagnétique.

2.2 ÉTUDE D'UN COMPLEXE DE TERBIUM FORTEMENT PARAMAGNÉTIQUE

Un complexe de Terbium (III) $[\text{Na}]_3[\text{Tb}(\text{DPA})_3]$ est choisi en complément des échantillons $[\text{Na}]_3[\text{Lu}(\text{DPA})_3]$ et $[\text{Na}]_3[\text{Yb}(\text{DPA})_3]$ déjà étudiés. Le Terbium est fortement paramagnétique et les signaux des protons **m** et **p** sont très larges (entre 60 et 120 Hz à mi-hauteur) et fortement déblindés vers 40 ppm (figure 36). Cet élargissement des signaux suggère des temps de relaxation très courts incompatibles avec une expérience de diffusion. Une mesure de T_1 par une expérience d'inversion-récupération donne $T_1(\mathbf{m}) = 2$ ms et $T_1(\mathbf{p}) = 5$ ms.

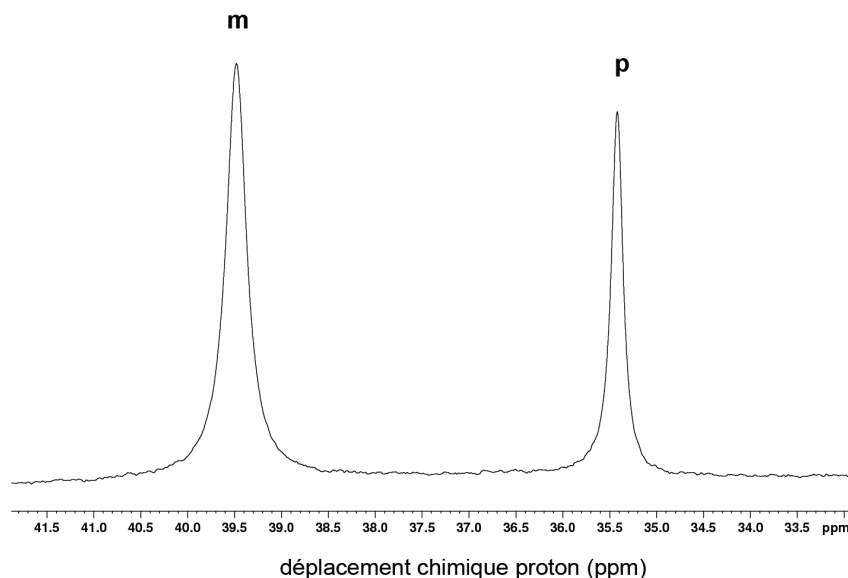


Figure 36 : spectre RMN ^1H de $[\text{Na}]_3[\text{Tb}(\text{DPA})_3]$ ($c = 10 \text{ mM}$) dans D_2O , zoom sur la région des signaux **m** et **p**.

Le complexe $[\text{Na}]_3[\text{Tb}(\text{DPA})_3]$ ne permet d'observer que deux signaux correspondant aux protons aromatiques des résidus dipicolinates, situés dans la 1^{ère} sphère de coordination de l'ion Lanthanide. Cependant d'autres systèmes $[\text{A}]_3[\text{Tb}(\text{DPA})_3]$ ont été étudiés dans l'équipe, avec A un cation mimant la chaîne latérale d'un acide aminé (ethylguanidium, ethylammonium ou imidazolium).^{29, 66} Les protons du cation sont alors dans la 2^{ème} sphère de coordination de l'ion Lanthanide et donc plus éloignés du centre paramagnétique que les protons des ligands dipicolinates situés dans la première sphère de coordination. Une mesure de T_1 est réalisée sur l'échantillon $[\text{EtGua}]_3[\text{Tb}(\text{DPA})_3]$ et on détermine $T_1 = 18 \text{ ms}$ pour les protons du CH_2 et $T_1 = 24 \text{ ms}$ pour ceux du CH_3 de l'Ethylguanidium.

Il est important de rappeler que la valeur de T_1 impose une limite au délai de diffusion Δ de l'expérience. En effet, la perte d'intensité du signal RMN causée par la diffusion des molécules est mesurée au moyen d'un délai Δ au cours duquel l'aimantation est longitudinale. Par conséquent, pendant Δ l'aimantation subit également un processus de relaxation longitudinale qui peut interférer avec l'effet de la diffusion sur l'évolution macroscopique de l'aimantation. Si le temps de relaxation T_1 est plus court que Δ , alors l'aimantation sera en grande partie revenue à l'équilibre avant l'application du gradient de refocalisation et une perte de signal sera observée. Une valeur de T_1 courte, d'environ 20 ms, est-elle alors suffisante pour permettre la mesure de la mobilité des molécules avec un équipement de RMN liquide standard, en dépit de la perte de sensibilité engendrée ? La limite inférieure de notre instrument est atteinte pour des polymères ou des liquides ioniques diffusant très lentement : $D = 5.10^{-12} \text{ m}^2.\text{s}^{-1}$ mesuré avec $\Delta = 200 \text{ ms}$, ce qui correspond à un déplacement moyen de 5.10^{-13} m^2 . On peut noter qu'une sonde spécifique associée à un amplificateur gradient puissant pourrait, sous certaines conditions, mesurer des coefficients de diffusion

plus petits, jusqu'à $1.10^{-15} \text{ m}^2.\text{s}^{-1}$, en mettant en œuvre des gradients de champs pulsés de l'ordre de 1000 G.cm^{-1} , mais notre spectromètre n'est pas équipé de ce type d'accessoire.¹¹⁶

Ici, le complexe $[\text{Ln}(\text{DPA})_3]^{3-}$ diffuse à une vitesse d'environ $350.10^{-12} \text{ m}^2.\text{s}^{-1}$, ce coefficient de diffusion est plus grand que la limite de notre appareillage par deux ordres de grandeurs, Une valeur de T_1 d'environ 20 ms devrait permettre de mesurer un coefficient de diffusion pourvu que le délai de diffusion Δ soit adapté selon les valeurs de T_1 et de δ (voir figure 25).

En conséquent le système $[\text{EtGua}]_3[\text{Tb}(\text{DPA})_3]$ est préféré à $[\text{Na}]_3[\text{Tb}(\text{DPA})_3]$ pour tester l'influence du fort paramagnétisme du Terbium (III) sur la mesure de diffusion, la relaxation longitudinale des protons du cation semblant compatible avec une mesure de diffusion. En outre, la largeur de ces signaux est de l'ordre de 20 Hz à mi-hauteur (figure 37). Cette valeur est comparable à celle observée pour le système $[\text{Na}]_3[\text{Yb}(\text{DPA})_3]$ étudié précédemment, la relaxation transversale ne devrait donc pas non plus poser de problème. Cette hypothèse est en accord avec les observations d'un article publié en 2019, qui tente de rationaliser l'impact des valeurs de T_1 et T_2 sur la mesure par RMN d'un coefficient de diffusion pour des complexes paramagnétiques.⁹¹

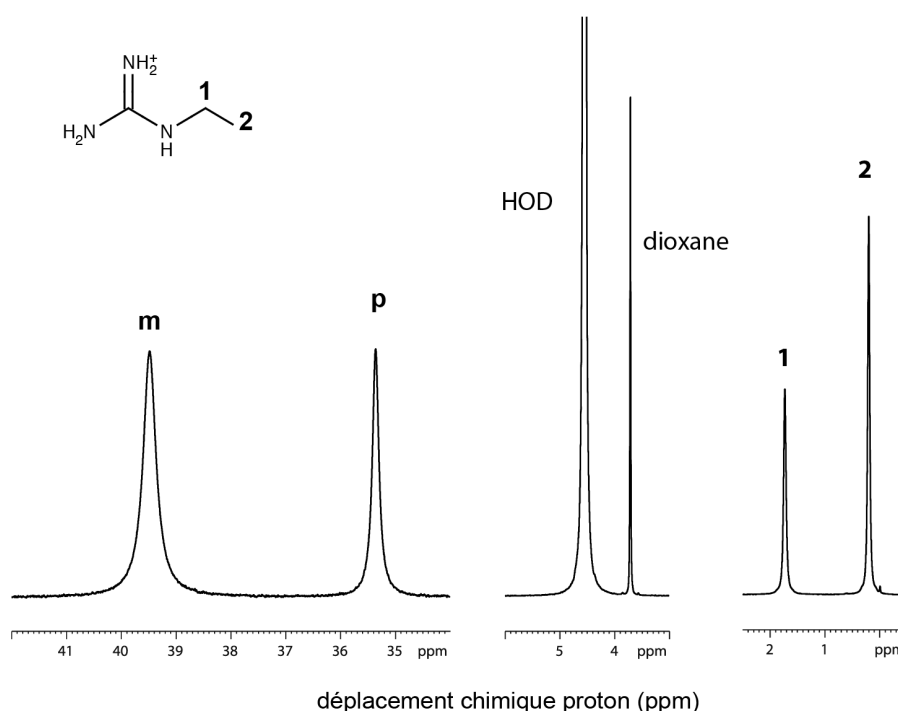


Figure 37 : spectre RMN ^1H de $[\text{EtGua}]_3[\text{Tb}(\text{DPA})_3]$ ($c = 10 \text{ mM}$) dans D_2O , en présence de 1,4-dioxane ($c = 5 \text{ mM}$). Zoom sur les régions des signaux du complexe de Terbium (III) et de l'éthylguanidium. Les agrandissements utilisent la même échelle et il est donc possible de comparer la largeur des signaux des différentes régions.

Les paramètres sont optimisés pour un échantillon paramagnétique avec une relaxation longitudinale rapide. Le délai de diffusion est court ($\Delta = 50 \text{ ms}$) pour éviter une relaxation complète du système avant la fin du délai. La relaxation longitudinale rapide des protons

permet d'utiliser un délai de relaxation court ($D1 = 0,4$ s). Le nombre de scans est augmenté ($NS = 128$) pour compenser la faible intensité des signaux larges. La mesure de diffusion est répétée 3 fois sur un échantillon de $[EtGua]_3[Tb(DPA)_3]$ ($c = 10$ mM dans D_2O , avec 5 mM de 1,4-dioxane comme référence interne). Les rapports de diffusion des protons **1** et **2** de l'éthylguanidium sont utilisés pour déterminer une valeur moyenne $R = 0,793 \pm 0,008$ (incertitude relative de 1% selon l'étude de précision de la mesure). Comme attendu, les signaux des protons **m** et **p** ne sont pas observés.

Il est possible de mesurer la diffusion des protons des dipicolinates d'un système modérément paramagnétique $[Na]_3[Yb(DPA)_3]$. Dans le cas d'un système fortement paramagnétique $[EtGua]_3[Tb(DPA)_3]$ il est possible de mesurer la diffusion des protons du cation, dans la 2^{ème} sphère de coordination de l'ion Terbium (III). La prochaine étape consiste à tester la mesure de diffusion de façon systématique sur une série $[EtGua]_3[Ln(DPA)_3]$ en faisant varier l'ion Lanthanide.

2.3 TEST D'UNE SÉRIE DE LANTHANIDES PARAMAGNÉTIQUES

Une série d'adduits $[EtGua]_3[Ln(DPA)_3]$ est préparée en faisant varier l'ion Lanthanide ($Ln = Lu, Sm, Eu, Pr, Yb, Tm, Tb$ ou Dy). Le rayon hydrodynamique étant homogène sur la série des Lanthanides, la diffusion des deux partenaires du système devrait être indépendante de l'ion central. La relaxation longitudinale T_1 est tout d'abord mesurée pour les protons chaque espèce en solution. Ensuite la mesure de diffusion est répétée 3 fois pour chaque adduit, et une valeur moyenne est retenue pour R (tableau 3).

Les valeurs de R sont très similaires dans toute la série de mesures, quel que soit le Lanthanide, et ce pour les 2 partenaires du système, $[Ln(DPA)_3]^{3-}$ et $EtGua^+$. Ainsi, s'il est impossible de mesurer directement la diffusion d'un soluté en présence d'un ion fortement paramagnétique, l'étude d'un équivalent diamagnétique, voire faiblement paramagnétique, est effectivement une bonne approximation. C'est le cas pour les adduits Dysprosium (III) et Terbium (III), pour lequel il n'est pas possible de mesurer la diffusion des protons des dipicolinates. Cependant on peut estimer un rapport de diffusion 0,389 pour ces protons (moyennes des valeurs mesurées pour les autres adduits de la série). Pour les autres ions Lanthanides il n'est pas nécessaire de passer par un équivalent diamagnétique pour la mesure de diffusion.

	<i>R</i>		<i>relaxation T_1 (ms)</i>			
	[Ln(DPA) ₃] ³⁻	EtGua ⁺	m	p	1	2
[EtGua] ₃ [Lu(DPA) ₃]	0,383	0,787	2320	1420	2790	2710
[EtGua] ₃ [Sm(DPA) ₃]	0,390	0,798	1210	1210	1950	2050
[EtGua] ₃ [Eu(DPA) ₃]	0,393	0,793	235	560	1160	1360
[EtGua] ₃ [Pr(DPA) ₃]	0,387	0,783	147	246	823	966
[EtGua] ₃ [Yb(DPA) ₃]	0,390	0,786	70	151	478	595
[EtGua] ₃ [Tm(DPA) ₃]	0,387	0,786	11	26	87	113
[EtGua] ₃ [Tb(DPA) ₃]	non	0,783	2	5	18	24
[EtGua] ₃ [Dy(DPA) ₃]	non	0,793	1	3	11	15

Tableau 3 : mesures de diffusion et de relaxation longitudinale T_1 pour une série d'échantillons [EtGua]₃[Ln(DPA)₃] ($c = 10$ mM) dans D₂O, en présence de 1,4-dioxane ($c = 5$ mM) avec Ln = Lu, Sm, Eu, Pr, Yb, Tm, Tb ou Dy. R est le ratio de diffusion moyen de tous les protons d'une espèce et son incertitude relative est estimée à 1%.

La méthode de mesure de diffusion est testée avec une séries d'adduits paramagnétiques [EtGua]₃[Ln(DPA)₃]. Il apparaît qu'un temps de relaxation T_1 très court n'empêche pas systématiquement la mesure d'un coefficient de diffusion, et qu'il est possible de mesurer les coefficients de diffusion de solutés en présence d'un complexe fortement paramagnétique. Dans les cas limites, où la mesure est affectée par le paramagnétisme, il est possible d'utiliser un équivalent diamagnétique. Le coefficient de diffusion mesuré est indépendant du Lanthanide choisi, avec une incertitude relative de 1%. Une telle étude était encore inédite au moment de la publication de notre article en 2016.¹¹⁷ En 2018, l'équipe de Q.-F. Sun a mis en œuvre une étude par RMN ¹H et DOSY d'une série de complexes de coordination, de formule M₄L₄, issus de l'auto-association de ligands L avec un métal M (M = Ca, Cd, La, Ce, Pr, Nd, Sm, Y, Yb, Lu ou Eu).¹¹⁸

3 - ÉTUDE D'UN SYSTÈME DYNAMIQUE

Le système [EtGua]₃[Tb(DPA)₃] a été caractérisé par titration RMN ¹H précédemment dans l'équipe.^{27, 66} Les données de RMN ont mis en évidence un système en échange rapide et une interaction représentée par une série de 3 équilibres avec une constante de dissociation $K_d = 5,3 \cdot 10^{-2}$ mM (figure 38).

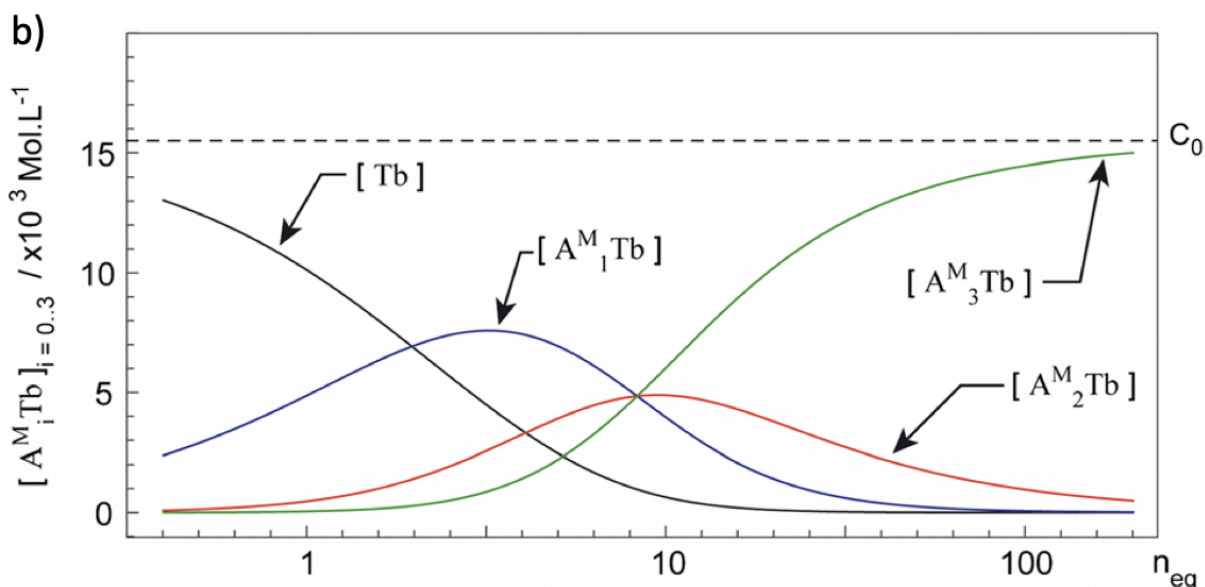
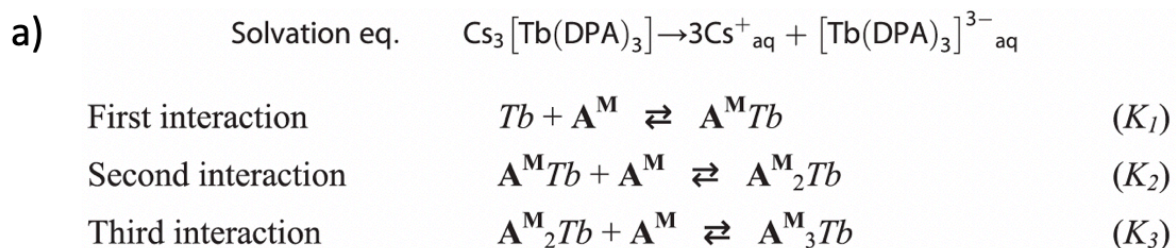


Figure 38 : simulation d'une titration par ajout de n_{eq} de EtGua^+ à un échantillon de $[\text{Tb}(\text{DPA})_3]^{3-}$. a) représentation schématique de l'interaction entre $[\text{Cs}]_3[\text{Tb}(\text{DPA})_3]$ (noté Tb) et les ions EtGua^+ (notés A^{M}) en solution, les 3 équilibres successifs sont caractérisés par les constantes K_1 , K_2 et K_3 , avec $\log K_1 = 1,9$ et $\log K_2 = \log K_3 = 1,0$.⁶⁶ b) Simulation de l'évolution des concentrations des différents adduits en solution au cours de la titration. La concentration initiale est $c_0 = 1,55 \text{ mM}$. Figure issue de ²⁷.

Ce système bien connu de notre équipe semble un modèle idéal pour tester une titration par mesure de diffusion. Au lieu d'observer la variation de déplacement chimique des protons de l'éthylguanidium, on va cette fois observer la diffusion des espèces en solution. Le système étant en échange rapide le coefficient de diffusion observé D_{obs} sera la moyenne des coefficients de diffusion des différentes espèces présentes en solution pondérés par leur proportion p_i ($i=1, 2, 3$) selon l'expression :

$$D_{\text{obs}} = p_{\text{libre}} D_{\text{libre}} + p_1 D_1 + p_2 D_2 + p_3 D_3 \quad \text{Équation 16}$$

avec D_1 le coefficient de diffusion de $[\text{EtGua}][\text{Ln}(\text{DPA})_3]^{2-}$, D_2 celui de $[\text{EtGua}]_2[\text{Ln}(\text{DPA})_3]^-$ et D_3 celui de $[\text{EtGua}]_3[\text{Ln}(\text{DPA})_3]$.

En choisissant un ion modérément paramagnétique il est possible de mesurer la diffusion des deux partenaires en interaction : le cation éthylguanidium et le complexe de tris-dipicolinate. Un complexe d'Ytterbium (III) est donc préféré au complexe de Terbium (III) afin de pouvoir exploiter les signaux des protons **m** et **p**. La diffusion de l'éthylguanidium est théoriquement

fortement ralentie quand il est en interaction avec $[\text{Ln}(\text{DPA})_3]^{3-}$, environ 10 fois plus lourd que le cation. A l'inverse, la diffusion du complexe de Lanthanide est faiblement affectée par l'interaction. Cependant, avec une précision de 1%, la variation du coefficient de diffusion observée pour les protons des dipicolinates devrait être significative et apporter des données supplémentaires pour caractériser le système.

La titration est menée avec une solution $[\text{Na}]_3[\text{Yb}(\text{DPA})_3]$ ($c = 10$ mM dans D_2O , avec 5 mM de 1,4-dioxane) à laquelle sont ajoutés progressivement jusqu'à 40 équivalents de $[\text{EtGua}][\text{Cl}]$. Les coefficients de diffusion sont mesurés pour tous les protons observés, en utilisant les paramètres optimisés précédemment. La titration est répétée 3 fois et la moyenne des 3 valeurs est utilisée pour le calcul, avec une incertitude relative estimée à 1%. La diffusion exprimée pour un soluté est la moyenne des valeurs mesurées pour chacun de ses protons. Ainsi, pour le complexe d'Ytterbium, $D(\text{Yb})$ est la moyenne des coefficients de diffusion des protons **m** et **p**, et pour l'éthylguanidium $D(\text{A}^{\text{M}})$ est la moyenne des coefficients de diffusion des protons **1** et **2**. Les coefficients de diffusion observés pour (Yb) et (A^{M}) sont définis selon les équations suivantes :

$$D_{\text{obs}}(\text{Yb}) = \frac{[\text{Yb}]_{\text{libre}} D_{\text{libre}}^{\text{Yb}} + [\text{A}^{\text{M}}\text{Yb}] D_1 + [\text{A}_2^{\text{M}}\text{Yb}] D_2 + [\text{A}_3^{\text{M}}\text{Yb}] D_3}{c_0} \quad \text{Équation 17}$$

$$D_{\text{obs}}(\text{A}^{\text{M}}) = \frac{[\text{A}^{\text{M}}]_{\text{libre}} D_{\text{libre}}^{\text{A}^{\text{M}}} + [\text{A}^{\text{M}}\text{Yb}] D_1 + 2 \cdot [\text{A}_2^{\text{M}}\text{Yb}] D_2 + 3 \cdot [\text{A}_3^{\text{M}}\text{Yb}] D_3}{n_{\text{eq}} \cdot c_0} \quad \text{Équation 18}$$

En parallèle, le coefficient de diffusion de l'éthylguanidium libre est mesuré pour un échantillon $[\text{EtGua}][\text{Cl}]$ ($c = 10$ mM dans D_2O , avec 5 mM de 1,4-dioxane), on observe $D_{\text{free}}^{\text{A}^{\text{M}}} = 802 \mu\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$. Les coefficients de diffusion des espèces $\text{A}^{\text{M}}\text{Yb}$, $\text{A}_2^{\text{M}}\text{Yb}$ et $\text{A}_3^{\text{M}}\text{Yb}$ sont estimés selon le modèle mis au point par l'équipe de G.A. Morris.⁸⁶ Le paramètre de densité effective ρ_{eff} utilisé dans ce modèle est calibré sur la valeur expérimentale $D_{\text{libre}}^{\text{Yb}}$ afin de prendre en compte la densité élevée du noyau d'Ytterbium.

Au-delà de 10 équivalents de $[\text{EtGua}][\text{Cl}]$ un précipité apparaît au fond du tube RMN à la fin de la mesure. Les expériences à 20 et 40 équivalents ne sont pas retenues pour le calcul, la qualité des spectres est altérée et le coefficient de diffusion du 1,4-dioxane varie de manière significative, ce qui peut indiquer un échantillon inhomogène et par conséquent une valeur de diffusion incorrecte.

Des courbes de diffusion sont simulées, basées sur l'analyse de l'évolution des déplacements chimiques et de la diffusion au cours de la titration. L'analyse combinée de ces 2 données expérimentales permet de déterminer les 3 constantes K_1 , K_2 et K_3 , avec $\log K_1 = 1,63$, $\log K_2 = 0,83$ et $\log K_3 = 0,94$. En parallèle, une analyse de type « courbe de titration » des données de déplacement chimique uniquement donne un jeu de constantes K'_1 , K'_2 et K'_3 , avec $\log K'_1 = 1,8$, $\log K'_2 = 1,0$ et $\log K'_3 = 1,1$. Ces valeurs sont utilisées pour simuler des courbes de diffusion. Les courbes simulées avec K'_1 , K'_2 et K'_3 ne permettent pas de reproduire

précisément l'évolution expérimentale de la diffusion (figure 39). L'exploitation combinée des données de déplacement chimique et de diffusion permet donc un bien meilleur accord entre le modèle et l'expérience.

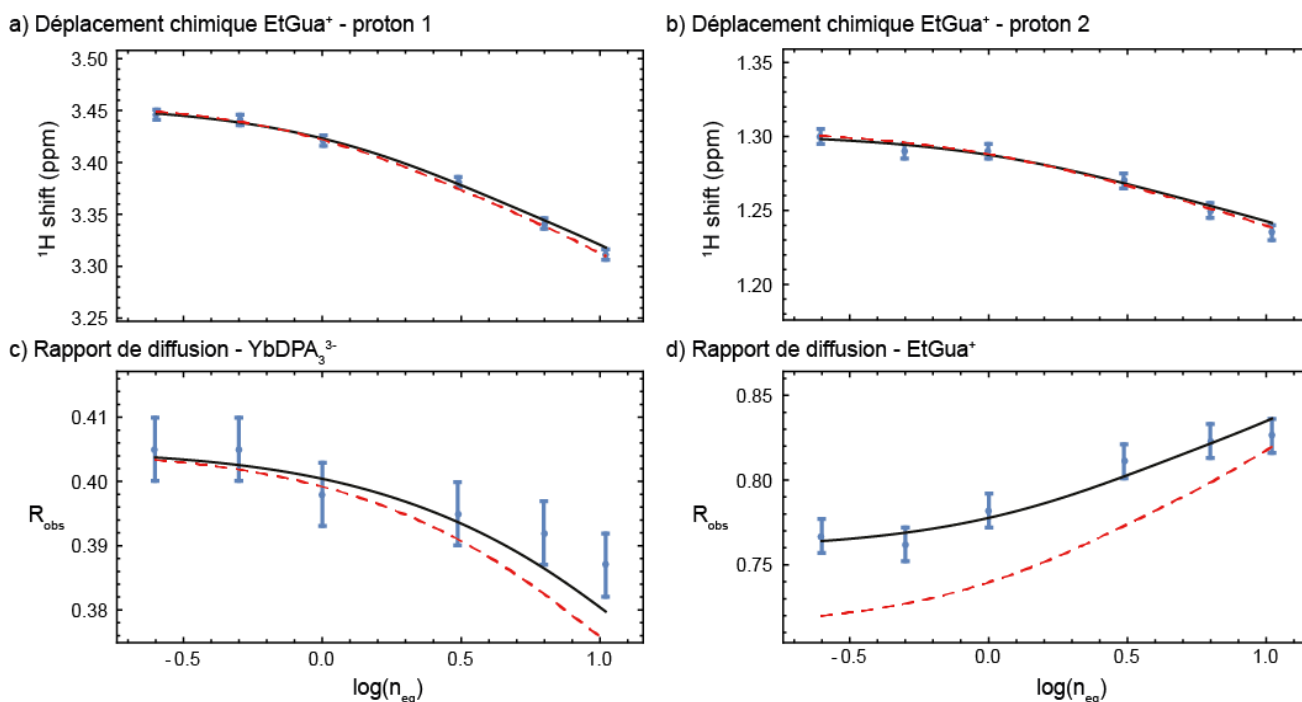


Figure 39 : titration par ajout de n_{eq} équivalents de $[EtGua][Cl]$ à une solution de $[Na]_3[Yb(DPA)_3]$ ($c = 10$ mM) dans D_2O , en présence de 1,4-dioxane ($c = 5$ mM). Variation de déplacement chimique pour les protons **1** (a) et **2** (b) de $EtGua^+$. Évolution des rapports de diffusion de $[Yb(DPA)_3]^{3-}$ (c) et de $EtGua^+$ (d). Les courbes en pointillé rouge sont simulées grâce aux constantes K'_1 , K'_2 et K'_3 issues de l'analyse des déplacements chimiques. Les courbes noires sont simulées grâce aux constantes K_1 , K_2 et K_3 issues de l'analyse combinée des déplacements chimiques et des valeurs de diffusion.

En conclusion pour cette partie, la titration par mesure de diffusion est adaptée à l'étude d'un système dynamique $[EtGua]_3[Ln(DPA)_3]$ en échange rapide caractérisé par une série de 3 équilibres et une affinité globale moyenne. Les résultats obtenus sont en accord avec ceux déterminés précédemment par une titration RMN 1H classique, et la combinaison des données issues des deux titrations permet d'améliorer le modèle de l'interaction et la précision des constantes calculées.

4 - CONCLUSION

La méthode de mesure de diffusion a été testée sur un système modèle, déjà étudié dans notre équipe, impliquant un complexe de tris-dipicolinate et un ion (sodium ou ethylguanidium). Après avoir optimisé les paramètres expérimentaux sur un système diamagnétique $[Na]_3[Lu(DPA)_3]$, et validé l'utilisation d'une référence interne, la précision de la mesure a été estimée à 1%. Dans un 2^{ème} temps la méthode a été testée sur un système

modérément paramagnétique $[\text{Na}]_3[\text{Yb}(\text{DPA})_3]$, puis sur une série de systèmes de paramagnétisme croissants $[\text{EtGua}]_3[\text{Ln}(\text{DPA})_3]$ avec $\text{Ln} = \text{Lu}, \text{Sm}, \text{Eu}, \text{Pr}, \text{Yb}, \text{Tm}, \text{Tb}$ ou Dy . Ces dernières mesures montrent qu'un temps de relaxation T_1 très court n'empêche pas systématiquement la mesure d'un coefficient de diffusion. Dans les cas limites, où la mesure est affectée par le paramagnétisme, il est possible d'utiliser un équivalent diamagnétique. Cette étude a fait l'objet d'un article, publié en 2016 (en annexe).¹¹⁷ Cet article présente en outre une application de la méthode de mesure de diffusion à un système biologique comportant une protéine modèle.

III - INTERACTION AVEC UNE PROTÉINE MODÈLE

Le protocole de mesure étant maintenant validé pour caractériser l'interaction d'un complexe de lanthanide avec une petite molécule, il est tentant de l'appliquer rapidement à l'étude de protéines modèles. L'étude par Diffraction des Rayons X de cristaux dérivés de protéines obtenus par co-cristallisation avec un complexe de lanthanide montre dans de nombreux cas une interaction forte entre les 2 partenaires, en particulier au niveau des arginines.^{27, 28, 73, 119, 120} L'observation de l'interaction en milieu liquide pourrait permettre de mieux comprendre le processus de cristallisation.

Deux protéines modèles, le lysozyme de blanc d'œuf de poule (HEWL) et l'ubiquitine, qui ont déjà été étudiées en interaction avec un complexe de lanthanide de type $[\text{Ln}(\text{DPA})_3]^{3-}$, sont choisies pour tester une titration par mesure de diffusion. L'utilisation de D_2O peut poser un problème de pH affectant la solubilité et la stabilité de la protéine et même du complexe de lanthanide. Il serait donc préférable d'utiliser une solution tampon, cependant certains sels ou ions pourraient interagir avec le complexe de lanthanide et affecter la solubilité, voire l'interaction avec la protéine. Des titrations sont donc testées tout d'abord dans D_2O , puis dans les tampons tris et PBS (phosphate salin). Le tampon tris semble interagir avec le système protéine - complexe (voir partie expérimentale) et ne sera finalement pas utilisé.

1 - CHOIX DU COMPLEXE DE LANTHANIDE

Nous avons montré que divers complexes $[\text{Ln}(\text{DPA})_3]^{3-}$, avec des propriétés paramagnétiques variables, sont compatibles avec des mesures de diffusion par RMN. Dans le cas d'un système avec une protéine, le complexe de lanthanide ($M = 636$ à 670 g.mol^{-1} selon le lanthanide) sera certainement plus mobile en solution qu'une macromolécule, de masse moléculaire élevée ($M = 14300 \text{ g.mol}^{-1}$ pour le lysozyme et $M = 8600 \text{ g.mol}^{-1}$ pour l'ubiquitine). La diffusion du complexe de lanthanide sera plus ralentie par l'interaction que celle de la protéine, il faut prévoir un complexe pour lequel il est possible de mesurer un coefficient de diffusion. Nous écartons donc les complexes de Terbium (III) et de Dysprosium (III), le T_1 des protons des dipicolinates étant trop court pour ces expériences. Le complexe de Praséodyme (III) $[\text{Pr}(\text{DPA})_3]^{3-}$, est choisi parmi les candidats restant: les signaux des protons des dipicolinates (δ vers 12 ppm) ne sont pas superposés avec ceux de la protéine, ce qui va simplifier l'analyse des données de diffusion (figure 40).

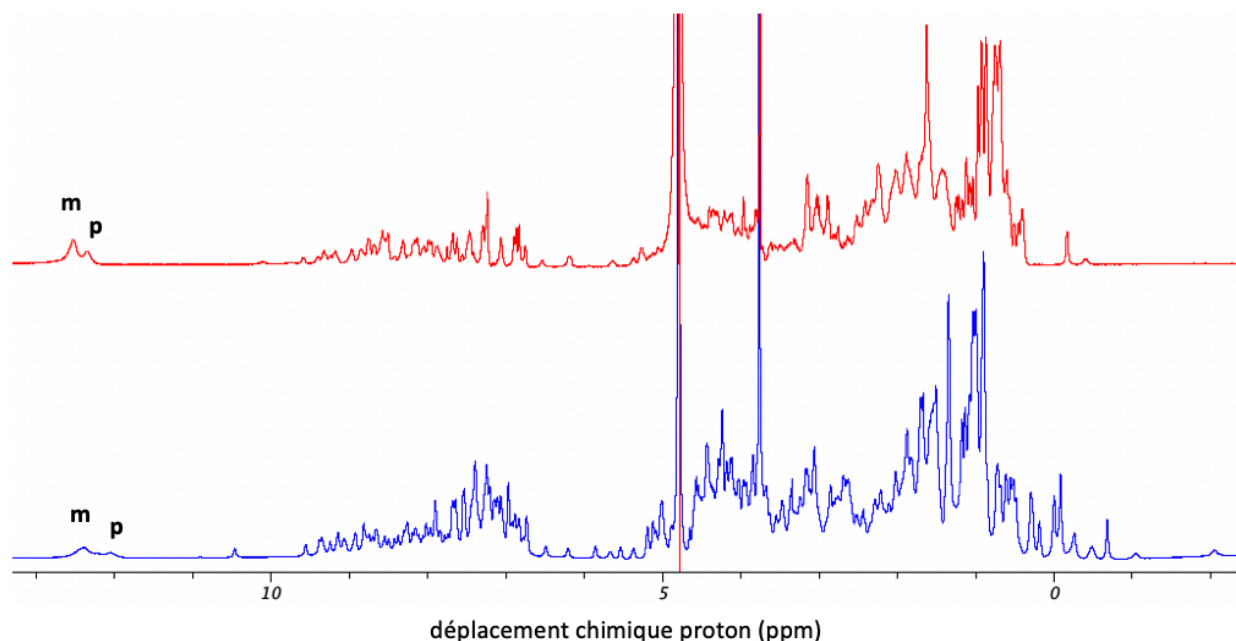


Figure 40 : spectre RMN ^1H de l'ubiquitine (enregistré à 500 MHz, en rouge) et du lysozyme (enregistré à 600 MHz, en bleu) en présence de 1 équivalent de $[\text{Na}]_3[\text{Pr}(\text{DPA})_3]$. Les signaux des protons **m** et **p** des groupements dipicolinates sont indiqués ($\delta_{1\text{H}} \approx 12,5$ ppm).

2 - HEWL

Le lysozyme de blanc d'œuf de poule (HEWL) est une protéine modèle de 129 acides aminés (pour un poids de 14,3 kDa) fréquemment utilisée par les biologistes, qui cristallise dans de nombreuses conditions, et qui est disponible commercialement. L'observation de cristaux dérivés de sa co-cristallisation avec un complexe d'Europium a montré 5 sites d'interaction par protéine comportant tous une arginine qui serait impliquée dans l'interaction.²⁸ Le lysozyme a aussi été étudié par RMN paramagnétique en solution en présence de complexes $\text{Ln}(\text{DPA})_3^{3-}$ (figure 20), et un seul site d'interaction (près de l'arginine 128) a été mis en évidence.⁷³

Une première solution de HEWL est préparée ($c = 1$ mM) dans D_2O , en présence de 1,4-dioxane ($c = 5$ mM), à laquelle est ajoutée une solution de $[\text{Na}]_3[\text{Pr}(\text{DPA})_3]$. Un précipité apparaît dans le tube RMN à la sortie du spectromètre, bien que la concentration en $\text{Pr}(\text{DPA})_3^{3-}$ soit faible ($c = 1$ mM). Après vérification, la solubilité est estimée à 10 mg.ml^{-1} dans l'eau et le pI de HEWL est de 11,3. La concentration de notre échantillon ($c = 1$ mM) est élevée et les modifications du pH avec l'ajout du complexe de dipicolinates peuvent compromettre la solubilité de l'échantillon.

Un second échantillon est préparé ($c = 1 \text{ mM}$) dans un tampon PBS ($c = 10 \text{ mM}$, $\text{pH } 7$) afin de s'affranchir des variations de pH . Malgré cette précaution un précipité, et même des cristaux, sont encore observés dans le tube RMN à la sortie du spectromètre (figure 41). Il nous apparaît peu rigoureux de faire une titration dans ces conditions et il est décidé de changer de protéine modèle.



Figure 41 : échantillons de lysozyme ($c = 1 \text{ mM}$ dans un tampon PBS 10 mM , $\text{pH } 7$) en l'absence (à gauche) et en présence (à droite) de $[\text{Na}]_3[\text{Pr}(\text{DPA})_3]$ ($c = 1 \text{ mM}$).

3 - UBIQUITINE

3.1 RÉSULTATS PRÉCÉDENTS

L'ubiquitine est une autre protéine modèle de 76 acides aminés (pour un poids de $8,6 \text{ kDa}$, et un pI de $6,8$) fréquemment utilisée par les biologistes. Elle a été étudiée par RMN en solution en interaction avec divers complexes de lanthanides (dont $[\text{Ln}(\text{DPA})_3]^{3-}$) par l'équipe de X.-C. Su et les résultats ont fait l'objet d'une publication en 2013.¹²⁰ L'article étudie les interactions non covalentes entre une protéine et un complexe de lanthanide, servant de tag paramagnétique, qui permet d'obtenir des contraintes structurales RMN. Cette stratégie de tag non covalent a été appliquée pour la première fois par notre équipe en 2007.^{27, 28} L'équipe de X.-C. Su a pour sa part étudié 5 complexes de lanthanides basés sur des dérivés de dipicolinates en interaction avec l'ubiquitine. Des expériences de RMN paramagnétique fournissent des contraintes de distances et d'angles pour le calcul de la structure tridimensionnelle du système. Les constantes de dissociation K_d des divers adduits sont aussi déterminées grâce à des expériences de titration par RMN ^1H , et l'interaction semble suivre un modèle 1:1 ($K_d = 0,29 \text{ mM}$ à $\text{pH } 6,4$ pour le système ubiquitine - $[\text{Ln}(\text{DPA})_3]^{3-}$). Un site

d'interaction principal est identifié sur la protéine, impliquant les lysines K6 et K48, ainsi que l'histidine H68 (figure 42).

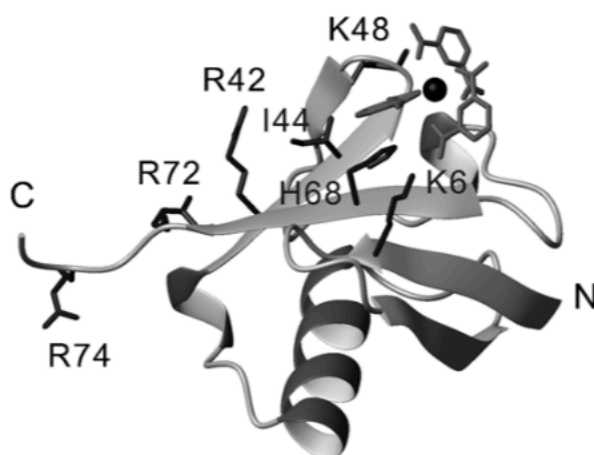


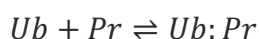
Figure 42 : représentation de la structure du système ubiquitine - $[Ln(DPA)_3]^{3-}$ (l'ion lanthanide est représenté par une sphère noire). Figure issue de ¹²⁰.

3.2 MESURE DE DIFFUSION PAR RMN

Un premier échantillon d'ubiquitine est préparé ($c = 1$ mM) en solution dans un tampon PBS ($c = 10$ mM, $pH \approx 7$, avec 10% de D_2O) en présence de 1,4-dioxane ($c = 2$ mM). Une titration en quelques points est prévue par ajout de 0,5 à 10 équivalents de $[Na]_3[Pr(DPA)_3]$. Pour comparaison, l'équipe de X.-C. Su a travaillé avec un échantillon de protéine plus dilué ($c = 0,1$ mM), un pH similaire ($pH = 6,4$ ou $7,6$) et entre 0,3 et 3 équivalents de complexe de lanthanide.

La diffusion est mesurée par RMN à chaque point de la titration, selon la méthode précédemment optimisée et déjà appliquée au système $[EtGua]_3[Yb(DPA)_3]$. Contrairement aux systèmes précédents impliquant des petites molécules, le signal du dioxane est superposé avec les signaux de la protéine. La précision de la mesure de diffusion du dioxane est impactée, cependant il est possible d'assurer une précision de 3% (au lieu de 1%) sur le coefficient de diffusion si le signal du dioxane est significativement plus intense que les signaux des protons de la protéine (la concentration en dioxane doit être au moins 2 fois supérieure à celle de la protéine).

On observe un équilibre dynamique entre la protéine (Ub), le complexe de Praséodyme (III) (Pr) et l'adduit 1:1 (Ub :Pr)



Équation 19

La constante de dissociation pour ce système 1:1 protéine : ligand est définie par l'équation suivante :

$$K_d = \frac{[Ub][Pr]}{[Ub:Pr]} \quad \text{Équation 20}$$

où [Ub], [Pr] et [Ub:Pr] sont les concentrations d'ubiquitine, du complexe libre et de l'adduit protéine-complexe. Dans le cadre d'un échange rapide, le rapport de diffusion observé pour les signaux du complexe de Praséodyme, $R_{obs}(Pr)$, est la moyenne des rapports de diffusion des différentes espèces en solution pondérée par leur population selon l'expression :

$$R_{obs}(Pr) = \frac{[Pr] \cdot R(Pr) + [Ub:Pr] \cdot R(Ub:Pr)}{n_{eq} \cdot C_{Ub}^0} \quad \text{Équation 21}$$

où $R(Pr)$ et $R(Ub:Pr)$ sont les rapports de diffusion du complexe et du système protéine : complexe ; C_{Ub}^0 est la concentration initiale en protéine ; et n_{eq} est le nombre d'équivalents de complexe qui est ajouté à la solution. $R(Pr) = 0,402$ (mesuré précédemment) est utilisé dans le calcul. K_d ainsi que $R(Ub:Pr)$ sont ajustés par une méthode des moindres carrés. K_d est estimée à 5,4 mM (figure 43).

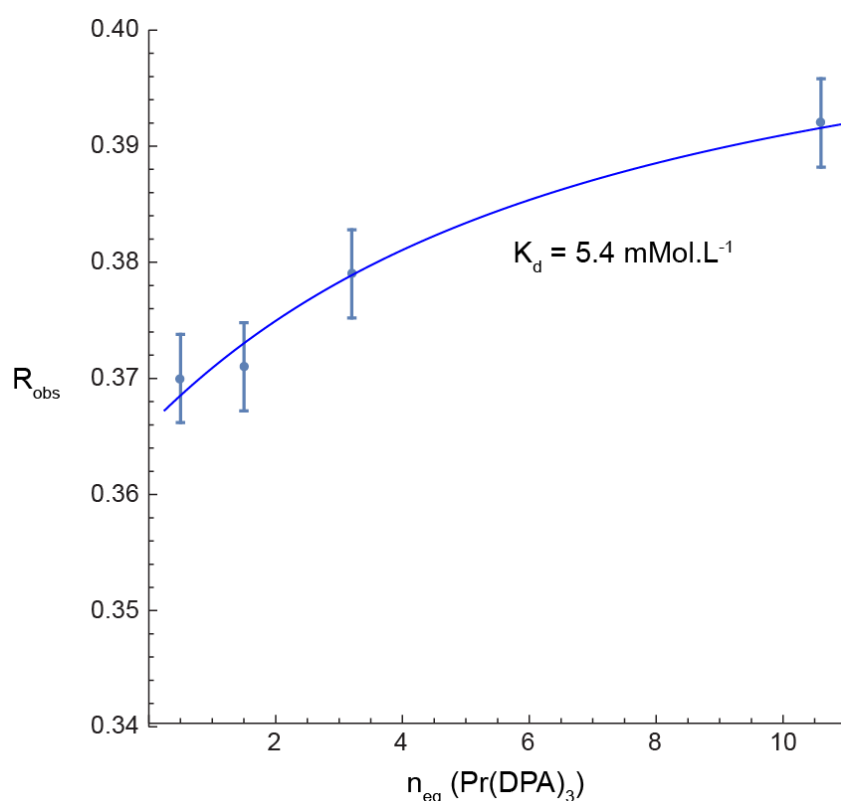


Figure 43 : titration par ajout de n_{eq} équivalents de $[Na]_3[Pr(DPA)_3]$ à une solution d'ubiquitine ($c = 1$ mM) dans un tampon PBS ($c = 18$ mM, pH 7.0, 10% D_2O) en présence de 1,4-dioxane ($c = 5$ mM) comme référence interne. Le rapport de diffusion $R_{obs} = D_{obs}/D_{ref}$ est représenté avec une barre d'erreur correspondant à l'incertitude relative de 1% de la méthode.

En parallèle des mesures de diffusion, des spectres 2D TOCSY sont enregistrés à chaque étape de la titration (figure 44). La protéine n'est pas marquée ^{15}N , ce qui motive le choix

d'une expérience TOCSY plutôt qu'une HSQC ^{15}N . A la lumière de l'étude d'interaction déjà réalisée sur ce système par l'équipe de X.-C. Su en 2013,¹²⁰ nous faisons l'hypothèse que notre échantillon se comporte comme un système 1:1 avec un unique site de liaison. Nous n'avons donc pas à ce stade cherché à identifier de novo les résidus impliqués dans l'interaction, et n'avons donc pas attribué les signaux du spectre TOCSY de la protéine en interaction. Quelques corrélations, dont la variation de déplacement chimique est significative au cours de la titration, sont utilisées pour déterminer une constante de dissociation $K_d' = 5,1 \pm 1,2$ mM. Ce résultat vient confirmer la valeur de K_d déterminée par mesure de diffusion.¹¹⁷

Cette constante de dissociation semble à première vue significativement différente de la valeur $K_d = 0,29$ mM calculée par l'équipe de X.-C. Su en 2013.¹²⁰ Cependant les conditions expérimentales diffèrent légèrement, notamment en termes de pH (pH = 6,4 pour la valeur $K_d = 0,29$ mM, pH = 7 pour la valeur $K_d = 5,4$ mM). D'après les travaux de Su *et al*, le pH modifie suffisamment l'état de protonation de l'histidine H68 pour affecter la force de l'interaction. Les mesures faites à pH = 7,6 (avec un autre complexe de lanthanide) suggèrent également une augmentation significative de la constante de dissociation.

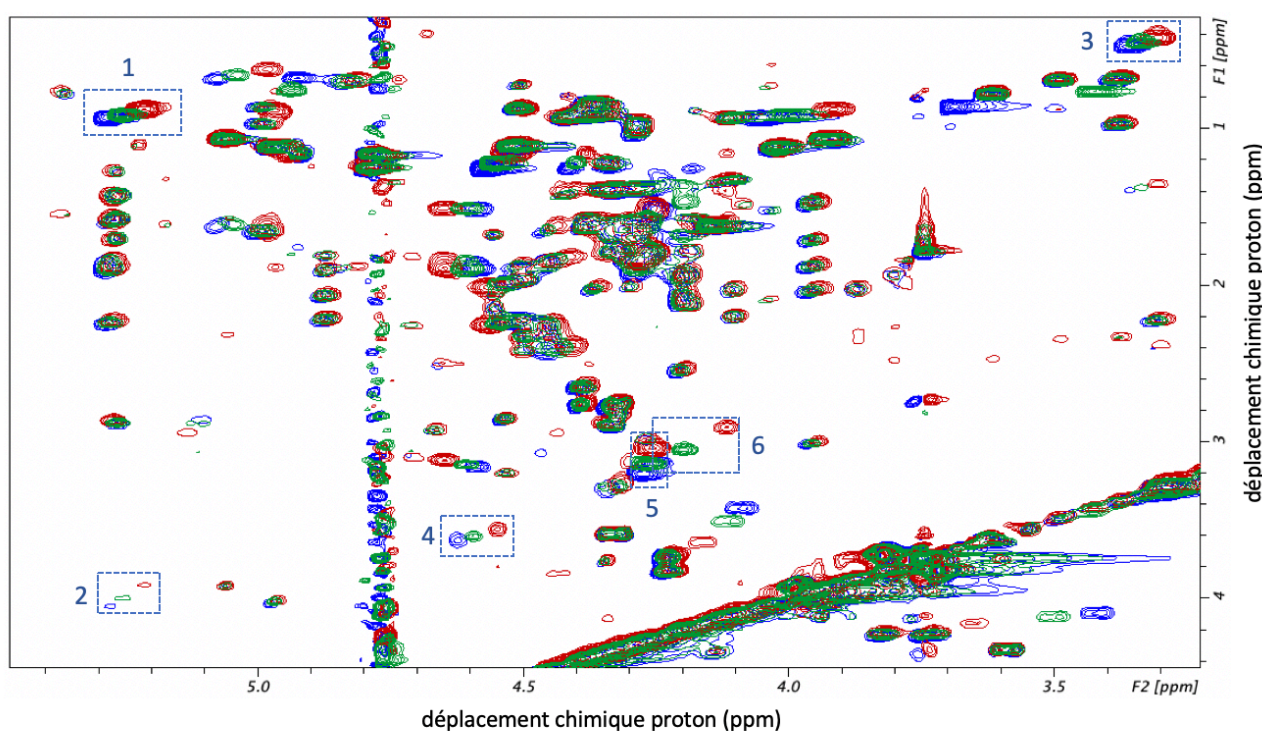


Figure 44 : spectres TOCSY d'une solution d'ubiquitine ($c = 1$ mM) dans un tampon PBS ($c = 18$ mM, pH 7.0, 10% D_2O) en présence de 1,4-dioxane ($c = 5$ mM) comme référence interne, en l'absence (en bleu) et en présence de 0,5 (en vert) et 1,5 (en rouge) équivalents de $[\text{Na}_3]\text{Pr}(\text{DPA})_3$. Les corrélations utilisées pour la détermination de K_d sont entourées et numérotées de 1 à 6.

3.3 RMN PARAMAGNÉTIQUE ET DYNAMIQUE MOLÉCULAIRE

Nous avons ensuite mené une étude complémentaire de RMN paramagnétique. L'utilisation d'un échantillon d'ubiquitine marquée ^{15}N a permis d'enregistrer des spectres HSQC ^{15}N en complément des spectres TOCSY et NOESY, aboutissant à l'attribution de 97% des signaux protons de la protéine. Une titration est alors réalisée par ajout de 0,5 à 10 équivalents de $[\text{Na}]_3[\text{Pr}(\text{DPA})_3]$ et la variation de déplacement chimique de chaque signal en fonction de la quantité de complexe de lanthanide est observée (figure 45).

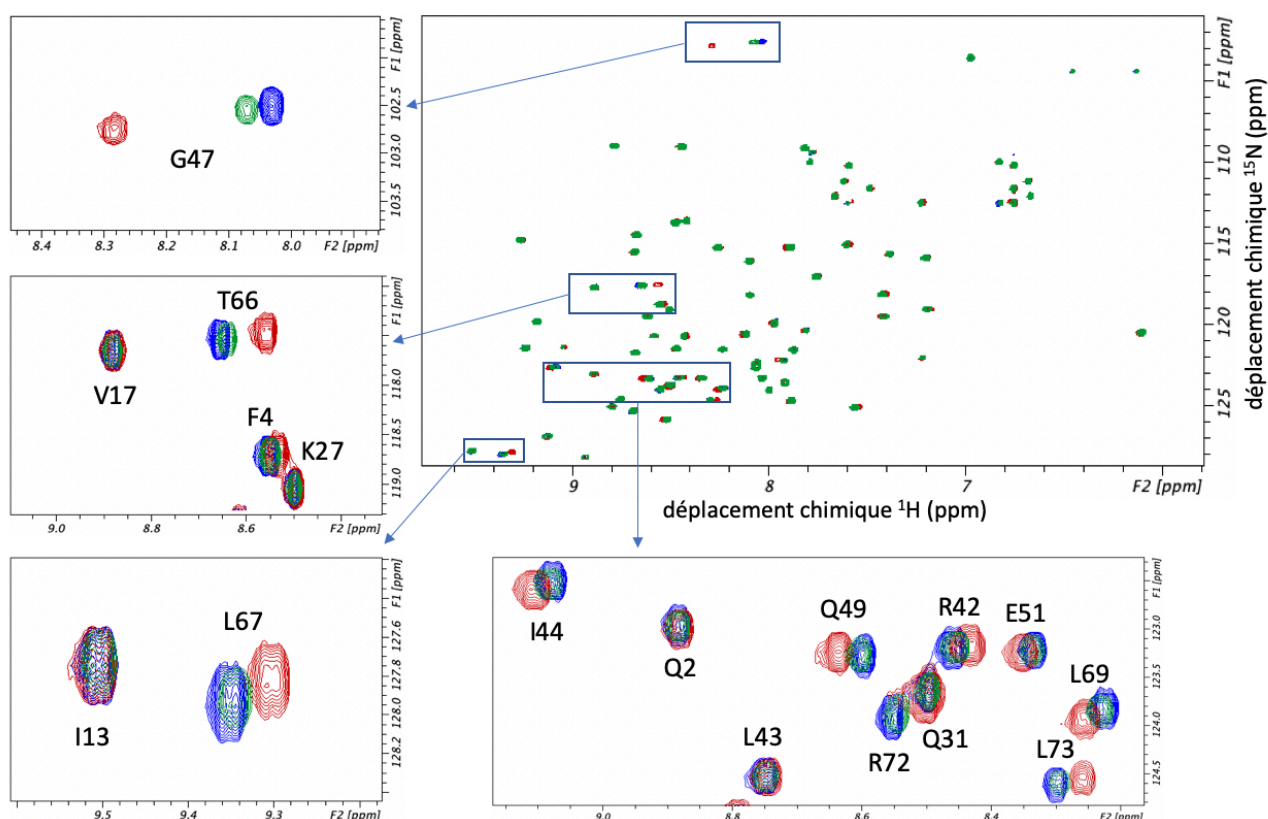


Figure 45 : spectres ^1H - ^{15}N HSQC d'un échantillon d'ubiquitine marquée ^{15}N ($c = 0,5 \text{ mM}$) dans un tampon PBS ($c = 50 \text{ mM}$, $\text{pH } 7,0$, $10\% \text{ D}_2\text{O}$) en l'absence (en bleu) et en présence de 0,5 (en vert) et 2 (en rouge) équivalents de $[\text{Na}]_3[\text{Pr}(\text{DPA})_3]$. Les régions encadrées sont agrandies et les corrélations sont identifiées.

Le paramagnétisme du Praséodyme (III) affecte le déplacement chimique des protons à proximité et les variations de déplacement chimique les plus fortes permettent d'identifier les protons impliqués dans l'interaction (figure 46a). Une étude par MD met en évidence trois sites d'interactions potentiels sur l'ubiquitine. Les données expérimentales de RMN montrent l'implication des résidus I44, A46, G47, K48, Q49, T66, L67, R72 et L73 ce qui valide une interaction pour deux des trois sites identifiés par MD (figure 46b-c). En outre, l'analyse de la variation de déplacement chimique des signaux des protons amides au cours de la titration permet de déterminer une constante de dissociation $K_d = 1,8 \pm 0,3 \text{ mM}$. Ce résultat est du

même ordre de grandeur que les constantes déterminées par mesure de diffusion et par TOCSY.

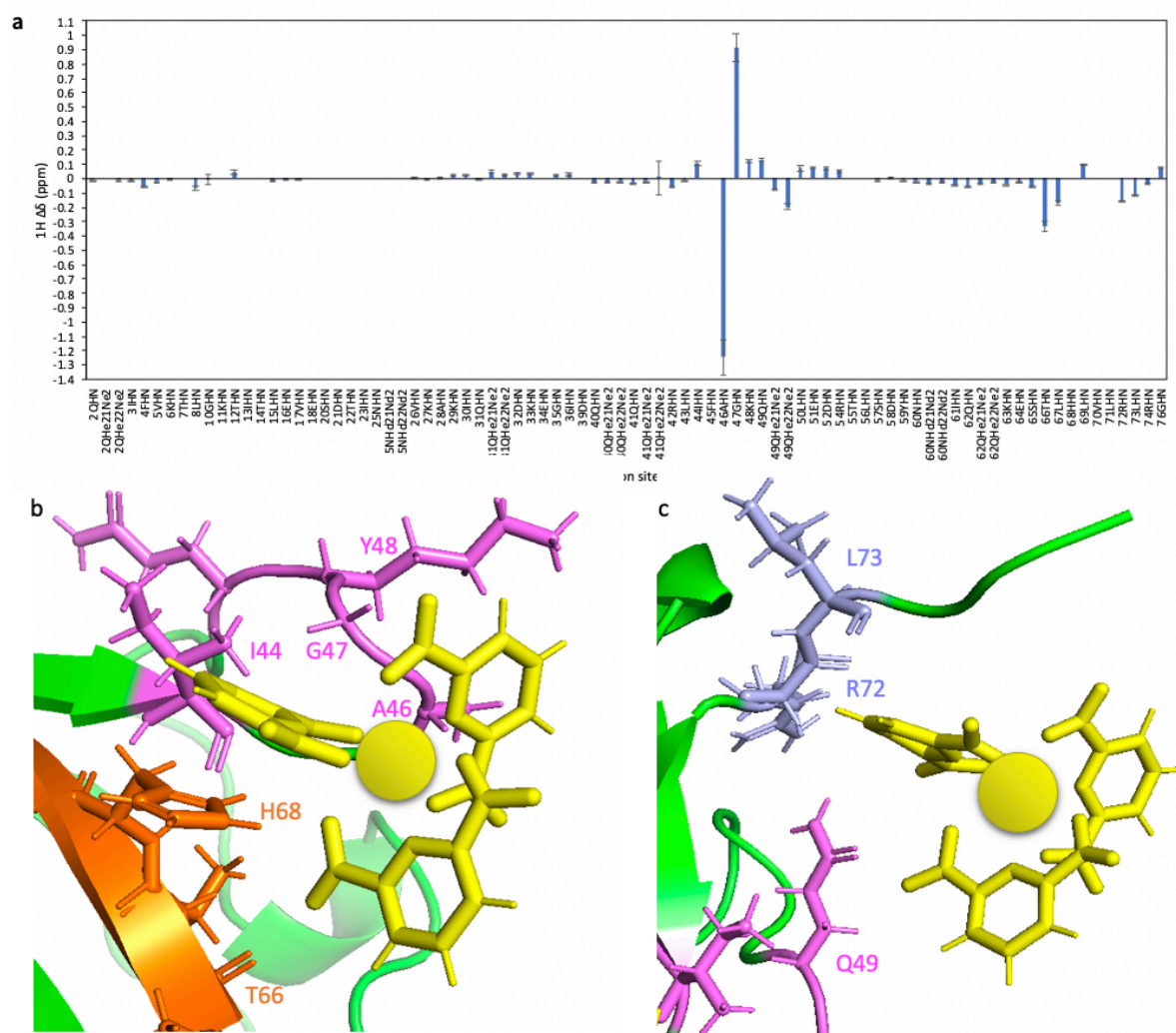


Figure 46 : a) variations de déplacement chimique pour chaque proton amide de l'ubiquitine $\Delta\delta = \delta_{\text{libre}} - \delta_{\text{lié}}$ avec $\delta_{\text{lié}}$ le déplacement chimique calculé pour l'adduit protéine-complexe. b-c) représentation de 2 des 3 sites d'interaction identifiés par MD. Le complexe de lanthanide est en jaune, et l'ion central est représenté par une sphère. Les acides aminés identifiés par RMN comme proches du centre paramagnétique sont indiqués.

Le site 1 identifié par MD et confirmé par les expériences de RMN paramagnétique semble identique à celui mis en évidence par l'équipe de X.-C. Su en 2013 (figure 47).¹²⁰ Cette étude considérait que ce site impliquait les résidus K6, R42, I44, K48 et H68 (figure 47a), et éliminait la possibilité d'un second site impliquant les résidus R72 et L73 de la boucle C-terminal, concluant que les PCS observés pour ces résidus était dus au passage du complexe paramagnétique près de ces résidus au cours de l'échange dynamique. Notre étude suggère qu'il y a bien un second site d'interaction (site 2), qui met en jeu des interactions

électrostatiques entre les arginines R42 et R74 et le complexe, clairement identifié par MD (figure 47b). Un site 3 est identifié par MD comme une cavité de forme complémentaire au complexe, mais les données expérimentales ne semblent pas confirmer cette interaction. Des expériences complémentaires de RMN paramagnétique, avec des complexes de Terbium (III) et de Gadolinium (III), sont en cours au laboratoire pour affiner la caractérisation du second site d'interaction.

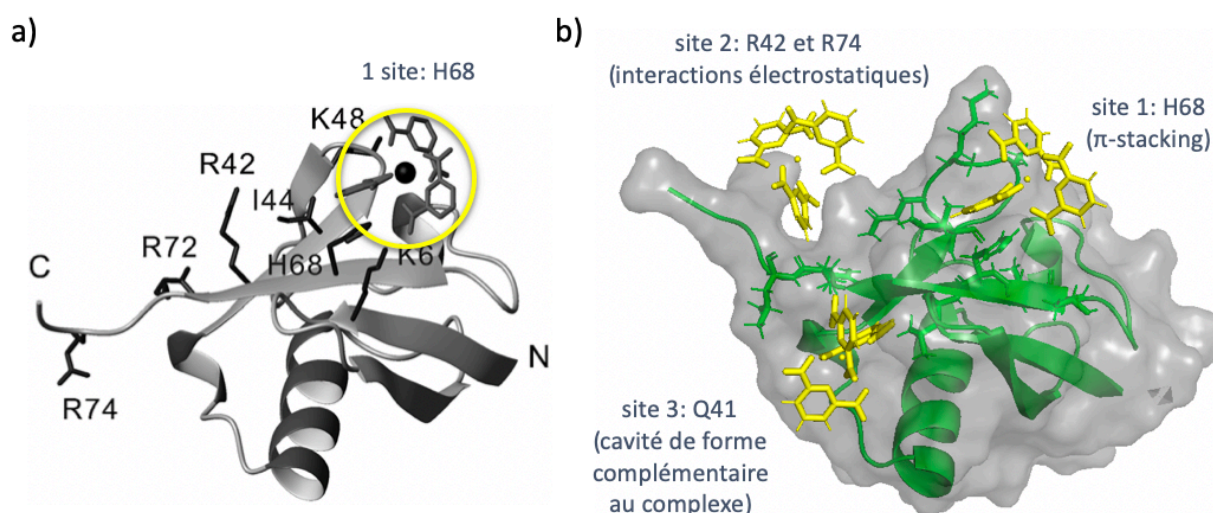


Figure 47 : modèles d'interaction entre l'ubiquitine et un complexe de lanthanide $[Ln(DPA)_3]^{3-}$. a) un site d'interaction déterminé par RMN par l'équipe de X.-C. Su en 2013.¹²⁰ b) trois sites d'interactions déterminés par Dynamique Moléculaire, les sites 1 et 2 étant validés par la RMN paramagnétique.

4 - CONCLUSION

Un système impliquant une protéine modèle, l'ubiquitine, et un complexe de lanthanide paramagnétique $[Pr(DPA)_3]^{3-}$ est étudié par RMN. Les deux partenaires sont de tailles très différentes (environ un ordre de grandeur), ainsi la diffusion du complexe ($M = 636 \text{ g.mol}^{-1}$) devrait être ralentie de manière significative par l'interaction avec l'ubiquitine ($M = 8600 \text{ g.mol}^{-1}$). Une titration par mesure de diffusion, basée sur l'observation des signaux du complexe de lanthanide, permet de déterminer une constante de dissociation pour ce système 1:1 en échange rapide. Le choix d'un complexe de Praséodyme (III) permet (i) d'éviter la superposition des signaux du complexe avec ceux de la protéine, pour une meilleure précision de la mesure de diffusion, et (ii) d'observer des variations de déplacements chimiques significatives à faible concentration en complexe pour les expériences de RMN paramagnétiques. Des expériences de RMN paramagnétiques associées à de la Dynamique Moléculaire permettent de préciser le mode d'interaction et de mettre en évidence deux sites d'interaction entre le complexe de Lanthanide et la protéine. Cette

observation suggère qu'un modèle d'interaction décrit par deux constantes K_d différentes devrait être considéré pour décrire plus fidèlement les données expérimentales. Cependant, l'analyse des courbes de titration obtenues pour chaque site d'interaction n'a pas permis de mesurer des affinités significativement différentes, ce qui peut s'expliquer notamment par des énergies d'interactions mises en jeu pour chaque site qui sont proches. Des études supplémentaires sont en cours pour déchiffrer le détail des propriétés d'interaction de l'ubiquitine avec les complexes de lanthanides.

Le complexe $[\text{Ln}(\text{DPA})_3]^{3-}$, qui est utilisé en cristallisation de protéine (comme agent de cristallisation et de diffusion anormale) montre ainsi un intérêt supplémentaire pour l'étude de protéine en solution, il est ainsi possible de comparer les structures d'un système protéine/complexe à l'état solide (cristal) et en solution.

IV - INTERACTION AVEC UN DÉCAPEPTIDE

La méthode de mesure de diffusion a été appliquée avec succès à l'étude de systèmes impliquant un complexe de lanthanide paramagnétique en interaction avec une petite molécule ou une protéine modèle. Avant de passer à l'étude d'autres systèmes biologique (protéines ou peptides) la méthode est testée sur un objet de taille intermédiaire : un petit peptide, intrinsèquement désordonné (IDP pour Intrinsically Disordered Peptide). Bien que plus petit qu'une protéine, ce peptide peut être beaucoup plus flexible et donc nécessiter de compléter l'étude par d'autres techniques.

1 - CHOIX D'UN PEPTIDE ET ÉTUDE PRÉLIMINAIRE

Plusieurs peptides d'une dizaine d'acides aminés sont à notre disposition pour des tests préliminaires. Nos critères de choix incluent (i) la présence de 2 ou 3 acides aminés chargés positivement, (ii) un spectre proton résolu à 400 MHz et (iii) une molécule soluble dans un tampon aqueux à pH neutre. Un peptide de séquence SASYKTLPRG disponible au laboratoire semble être un bon candidat, son point isoélectrique est 10,4 et les groupements amines des résidus S1, K5 et R9 ont donc une charge positive à pH neutre. Pour K5 et R9 il s'agit des amines en bout de chaîne latérale. Dans le cas de S1 la charge est sur le groupement amide N-terminal en l'absence de groupement protecteur. La masse molaire de SASY est de 1078 g.mol⁻¹, ce qui est du même ordre de grandeur que le complexe de lanthanide (636 à 670 g.mol⁻¹ selon le lanthanide).

Ce décapeptide, qui sera par la suite appelé « SASY », est analysé par TOCSY, ROESY et HSQC ¹³C (en abondance naturelle) en solution dans un tampon phosphate pH = 7,0 (figure 48). La séquence de ce peptide ne semble pas propice à un repliement stable en hélice, et la carte ROESY ne montre aucune corrélation typique d'une telle structure 3D.

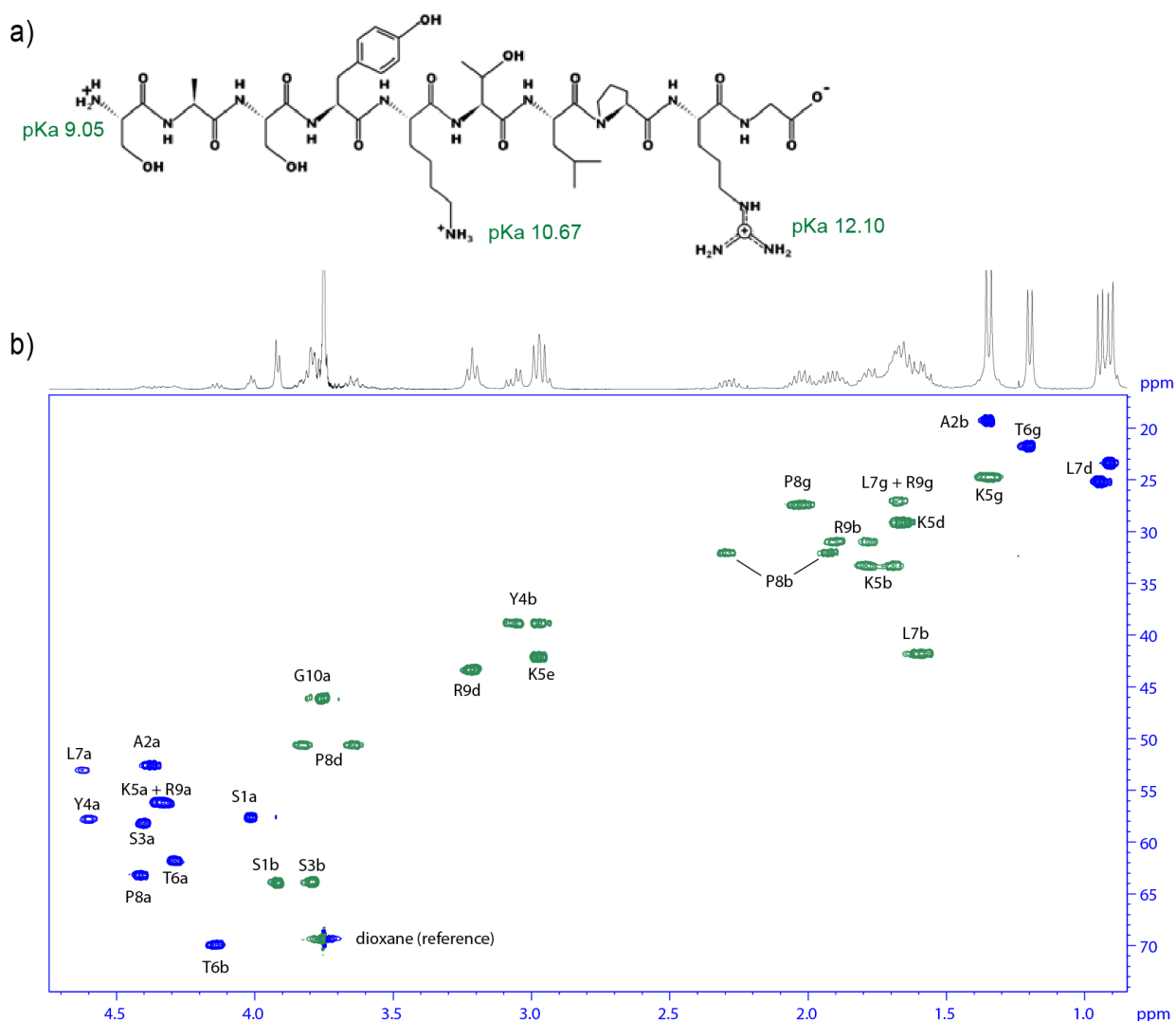


Figure 48 : a) séquence du décapeptide SASYKTLPARG à pH = 7, les pKa des 3 groupements amines sont indiqués. b) spectre HSQC ^{13}C de SASY ($c = 4 \text{ mM}$) dans un tampon PBS ($c = 18 \text{ mM}$, pH 7.0, 10% D_2O) en présence de 1,4-dioxane ($c = 5 \text{ mM}$) comme référence interne (les signaux du cycle aromatique de Y4 ne sont pas montrés sur ce zoom).

2 - MESURES DE DIFFUSION

2.1 TITRATION ET INCERTITUDE

Le complexe de Praséodyme $\text{Pr}(\text{DPA})_3^{3-}$, utilisé précédemment avec l'ubiquitine, est choisi pour les mesures de diffusion avec SASY. Une solution de peptide est préparée à une concentration de 2 mM dans un tampon PBS 18 mM à pH compris entre 6,5 et 7, avec 50 mM de NaCl, 5 mM de 1,4-dioxane et 10% de D_2O . Une titration est réalisée avec l'ajout de quantités croissantes de $[\text{Na}]_3[\text{Pr}(\text{DPA})_3]$. Les coefficients de diffusion des espèces en présence sont mesurés avec le protocole défini précédemment, et le nombre de scans est

adapté à la concentration en complexe (tableau 4). Un coefficient de diffusion $D = 493 \mu\text{m}^2.\text{s}^{-1}$ (et un rapport $R = 0,429$) est mesuré pour le complexe libre dans le même tampon, à une concentration 10 mM.

n_{eq}	$D(SASY)$	incertitude	$D([PrDPA_3])$	incertitude	$D(\text{dioxane})$	$R(SASY)$	$R([PrDPA_3])$
0	304	3	no		1140	0,267	x
0,2	300	3	491	60	1060	0,283	0,463
0,5	300	3	487	26	1040	0,288	0,468
1	295	3	481	17	1000	0,295	0,481
3	284	3	472	5	1060	0,268	0,445
5	276	3	465	5	1020	0,271	0,456
10	270	3	456	5	1060	0,255	0,430

Tableau 4 : résultats de la titration de SASY par ajout de n_{eq} de $[Na]_3[Pr(DPA)_3]$. Les coefficients de diffusion D sont donnés avec une incertitude relative de 1% pour le peptide. La valeur indiquée est une moyenne des valeurs mesurées pour les différents signaux du peptide. Pour le complexe de lanthanide l'incertitude indiquée est celle calculée par le logiciel DynamicsCenter.

Le signal du dioxane est superposé avec celui du proton H_α de G10. L'incertitude sur le coefficient de diffusion du dioxane est donc estimé à 3-5% par le logiciel d'analyse des données de diffusion, et non pas 1% comme déterminé lors de l'optimisation du protocole. La source principale d'incertitude est différente pour les signaux de dipicolinate : la concentration en complexe est faible (< 1 mM) pour les premiers points de la titration et le paramagnétisme du Praséodyme, bien que modéré est suffisant pour que l'élargissement des signaux dû au PRE affecte le rapport signal/bruit (figure 49). A 0,2 et 0,5 équivalents de complexe de lanthanide le rapport signal/bruit du massif des dipicolinates est estimé respectivement à 9 et 32, ce qui explique l'incertitude relative calculée par DynamicsCenter (respectivement 12% et 5%). Cette incertitude élevée n'est pas surprenante si l'on se réfère à notre étude préliminaire, qui montrait l'importance d'un rapport S/B suffisant pour garantir une incertitude de 1% (figure 32).

En outre, les 2 partenaires du système étant d'une taille assez similaire, la diffusion devrait être significativement ralentie par l'interaction quelle que soit l'espèce observée. La variation de la diffusion du peptide et du complexe va donc être analysée afin de déterminer une constante de dissociation.

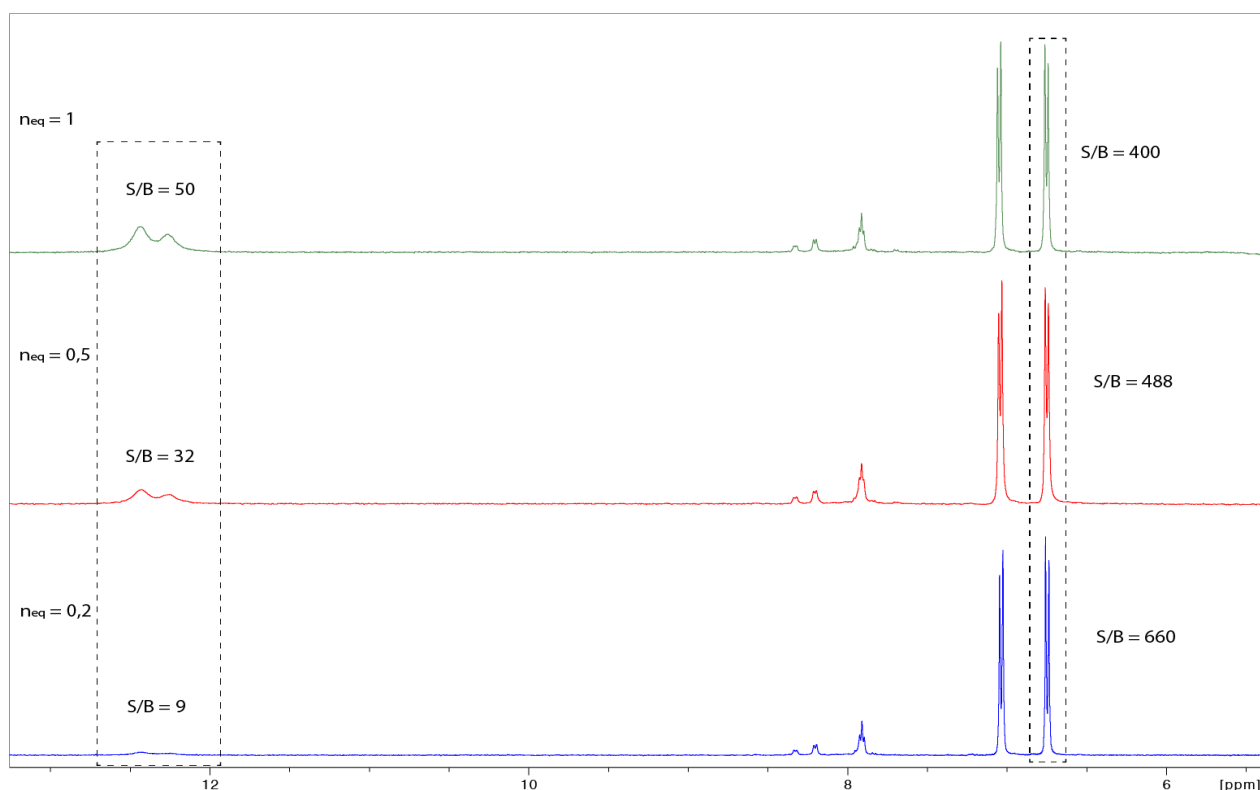


Figure 49 : comparaison du premier point (gradient = 2%) des expériences de diffusion de la titration de SASY avec 0,2 (en bas, en bleu), 0,5 (au milieu, en rouge) et 1 (en haut, en vert) équivalent de $[\text{Na}]_3[\text{Pr}(\text{DPA})_3]$. Le rapport signal/bruit (S/B) a été calculé pour un des protons aromatiques de Y4 (signal de droite) et pour la région des dipicolinates (entre 13 et 11,8 ppm). Les signaux des dipicolinates ont une largeur à mi-hauteur de 50 Hz environ. Le nombre de scans est de 256 pour 0,2 équivalent et de 128 scans pour 0,5 et 1 équivalent.

2.2 RÉSULTATS DE LA TITRATION : DÉTERMINATION DE K_D

2.2.1 Diffusion du peptide

Le système étant en échange rapide, le coefficient de diffusion observé D_{obs} représente la moyenne des coefficients de diffusion des espèces, libres et en interaction, pondérées par leur proportion dans la solution. Les équations illustrant un tel système sont rappelées au chapitre III.

L'évolution des données de diffusion de SASY au cours de la titration sont en accord avec un équilibre 1:1 et la constante de dissociation est estimée à une valeur moyenne $K_d = 7 \text{ mM}$ (figure 50).

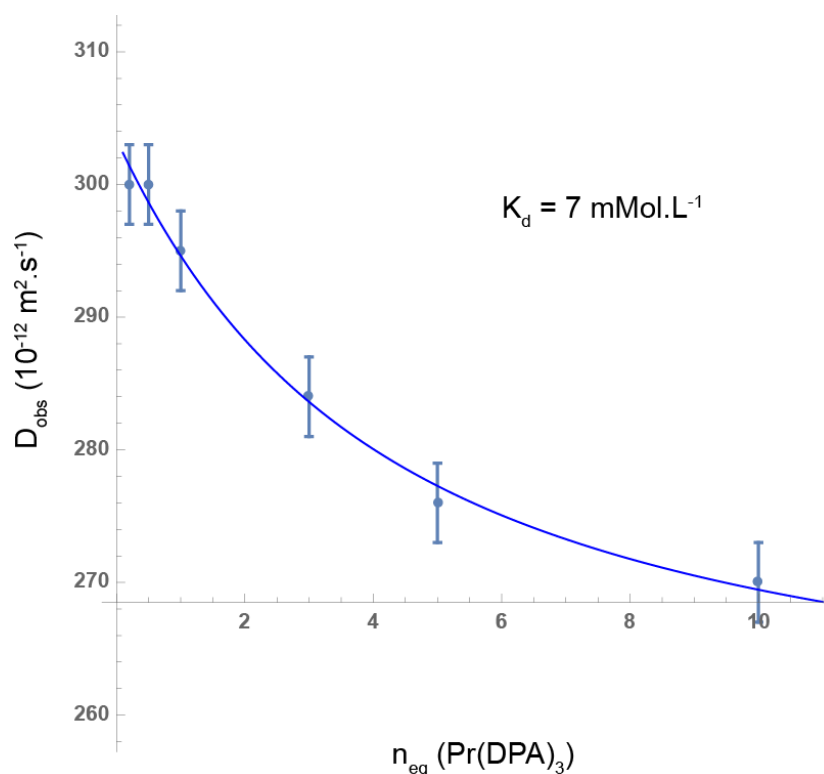


Figure 50 : titration par ajout de n_{eq} équivalents de $[Na]_3[Pr(DPA)_3]$ à une solution de peptide SASY ($c = 2$ mM). Le coefficient de diffusion D_{obs} est représenté avec une barre d'erreur correspondant à une incertitude relative de 1%.

2.2.2 Diffusion du complexe de Praseodyme

L'évolution des données de diffusion du complexe de lanthanide est elle aussi analysée mais ne semble pas correspondre à un équilibre 1:1. Une première explication tient dans l'incertitude élevée sur les mesures à 0,2 et 0,5 équivalents de complexe. En outre, il apparaît que dès le premier point de la titration la fraction en adduit est supérieure à 70%, en conséquence la variation de diffusion accessible avec notre instrumentation est faible (figure 51). Enfin, à partir de 5 équivalents un léger précipité apparaît dans le tube RMN. Si une partie du complexe de Praseodyme précipite, la composition du système n'est plus dictée par un simple équilibre 1:1 et le coefficient de diffusion observé reflète plus probablement l'existence de 2 équilibres (interaction en solution et précipitation).

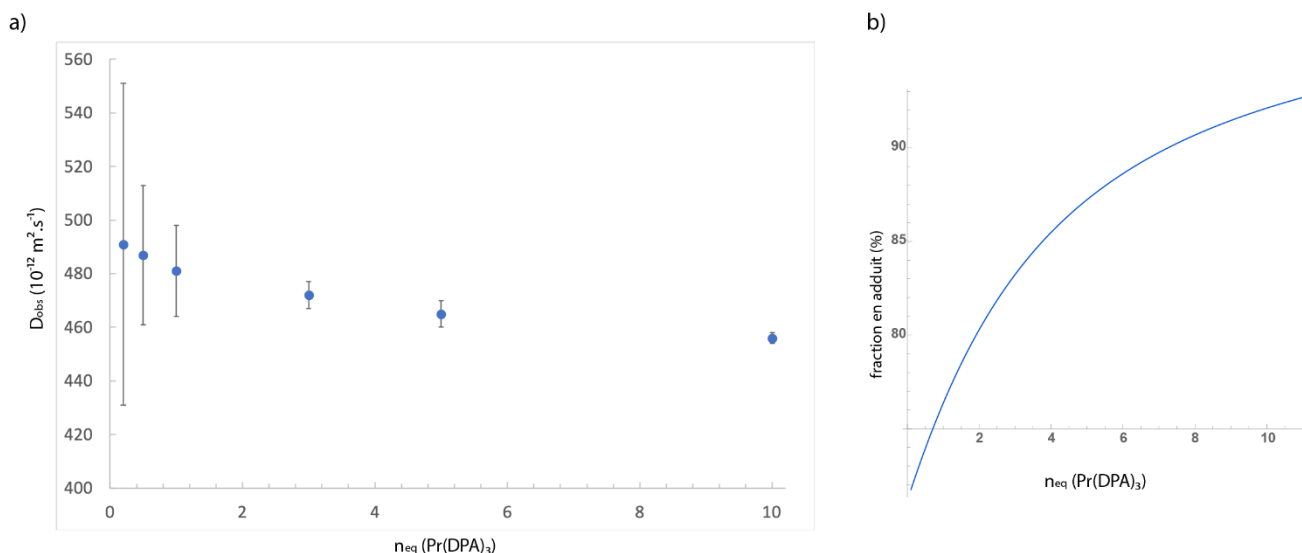


Figure 51 : a) titration par ajout de n_{eq} équivalents de $[\text{Na}]_3[\text{Pr}(\text{DPA})_3]$ à une solution de peptide SASY ($c = 2 \text{ mM}$). Le coefficient de diffusion D_{obs} est représenté avec une barre d'erreur correspondant à l'incertitude calculée par DynamicsCenter. b) modélisation de l'évolution de la fraction en complexe de lanthanide au cours de cette titration.

3 - RMN PARAMAGNÉTIQUE

Le paramagnétisme du complexe $\text{Ln}(\text{DPA})_3^{3-}$ peut être exploité ici et donner des informations supplémentaires sur l'interaction. Différents lanthanides sont choisis selon le paramètre à mesurer :

- le Terbium (III) est choisi pour les mesures de PCS, avec l'Yttrium comme équivalent diamagnétique
- le Gadolinium (III) est choisi pour les mesures de PRE

3.1 PCS (PSEUDO CONTACT SHIFTS)

Le PCS est défini comme la variation de déplacement chimique ($\Delta\delta$) induit par la présence d'un centre paramagnétique dans l'échantillon. Sa mesure nécessite 2 spectres : le 1^{er} est enregistré en présence d'un ion lanthanide diamagnétique (Y) et les déplacements chimiques observés sont appelés δ^{dia} ; le 2nd est enregistré en présence de l'ion paramagnétique (Tb), et les déplacements chimiques observés sont appelés δ^{obs} . La composante FCS étant négligeable pour ce système, le PCS est exprimé selon l'équation 9. En outre, le système étant en échange rapide, δ^{obs} représente la moyenne des déplacements chimiques des espèces, libres et en interaction, pondérés par leur proportion dans la solution.

Le PCS est fonction de la distance r entre le noyau observé et le centre paramagnétique, avec une dépendance en r^{-3} . Il dépend aussi de l'orientation du noyau par rapport au tenseur anisotrope du lanthanide (figure 19).

3.1.1 Détermination de K_d

Dans un premier temps, une titration est mise en œuvre avec le complexe de Terbium $Tb(DPA)_3^{3-}$, et des spectres HSQC ^{13}C et TOCSY sont enregistrés à chaque étape (figure 52). L'évolution du déplacement chimique δ^{obs} de chaque proton au cours de la titration est modélisée et 2 paramètres sont calculés : une constante de dissociation K_d et le déplacement chimique δ^{comp} , qui est le déplacement chimique du peptide dans l'adduit 1:1. En effet, pour éviter tout phénomène de précipitation dans l'échantillon, la titration est limitée à l'ajout de 5 équivalents de $[Na]_3[Tb(DPA)_3]^3$. Ces conditions permettent cependant d'observer une fraction en adduit supérieure à 85% (voir figure 51), ce qui rend possible un calcul juste.

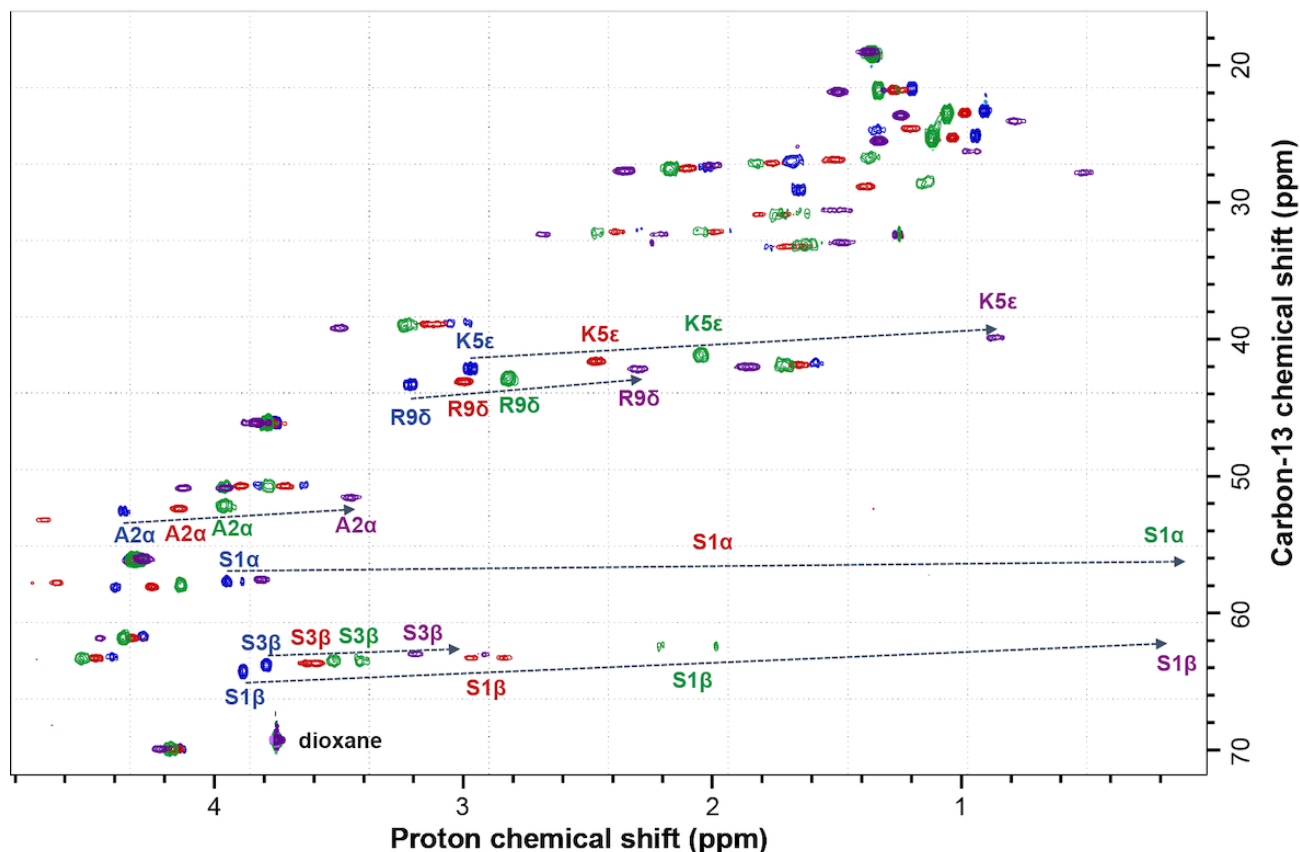


Figure 52 : spectres 1H - ^{13}C HSQC du peptide SASY seul ($c = 2$ mM) (en bleu) et avec 0,5 (en rouge), 1 (en vert) et 3 (en violet) équivalents de $[Na]_3[Tb(DPA)_3]^3$. Les variations les plus significatives sont attribuées.

Une étude statistique des valeurs de K_d déterminées pour chaque proton de SASY permet d'estimer une valeur moyenne $K_d = 8 \pm 2$ mMol.L $^{-1}$ (figure 53). Cette valeur est en accord avec celle mesurée par la titration en mesures de diffusion ($K_d = 7$ mMol.L $^{-1}$).

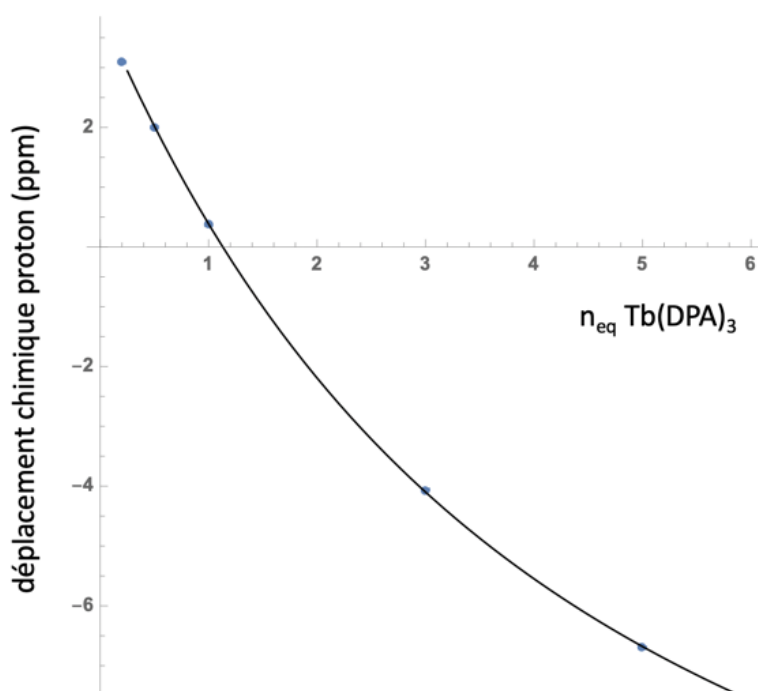


Figure 53 : évolution du déplacement chimique du proton S1a au cours d'une titration par ajout de n_{eq} équivalents de $[\text{Na}]_3[\text{Tb}(\text{DPA})_3]$ à une solution de peptide SASY ($c = 2 \text{ mM}$). Une valeur $K_d = 7 \text{ mMol.L}^{-1}$ est déterminée pour ce proton. La procédure est répétée pour tous les protons observés du peptide.

3.1.2 Étude des PCS

Une nouvelle titration est mise en œuvre, avec le complexe diamagnétique d'Yttrium $\text{Y}(\text{DPA})_3^{3-}$. Des spectres HSQC ^{13}C et TOCSY sont enregistrés à chaque étape et permettent d'obtenir les valeurs de δ^{dia} . L'évolution des déplacements chimiques δ^{dia} est modélisée et le déplacement chimique δ^{comp} est calculé. Cette valeur correspond au déplacement chimique qui serait observé si tous les peptides en solution dans l'échantillon étaient complexés simultanément. Les valeurs de δ^{dia} et de δ^{comp} sont utilisées pour calculer les δ^{para} , donc les PCS au cours de la titration. Les valeurs de PCS calculées au moyen des δ^{comp} (Terbium et Yttrium) représentent l'effet du centre paramagnétique sur les déplacements chimiques d'un adduit 1:1 de peptide et de $[\text{Ln}(\text{DPA})_3]^{3-}$ (figure 54).

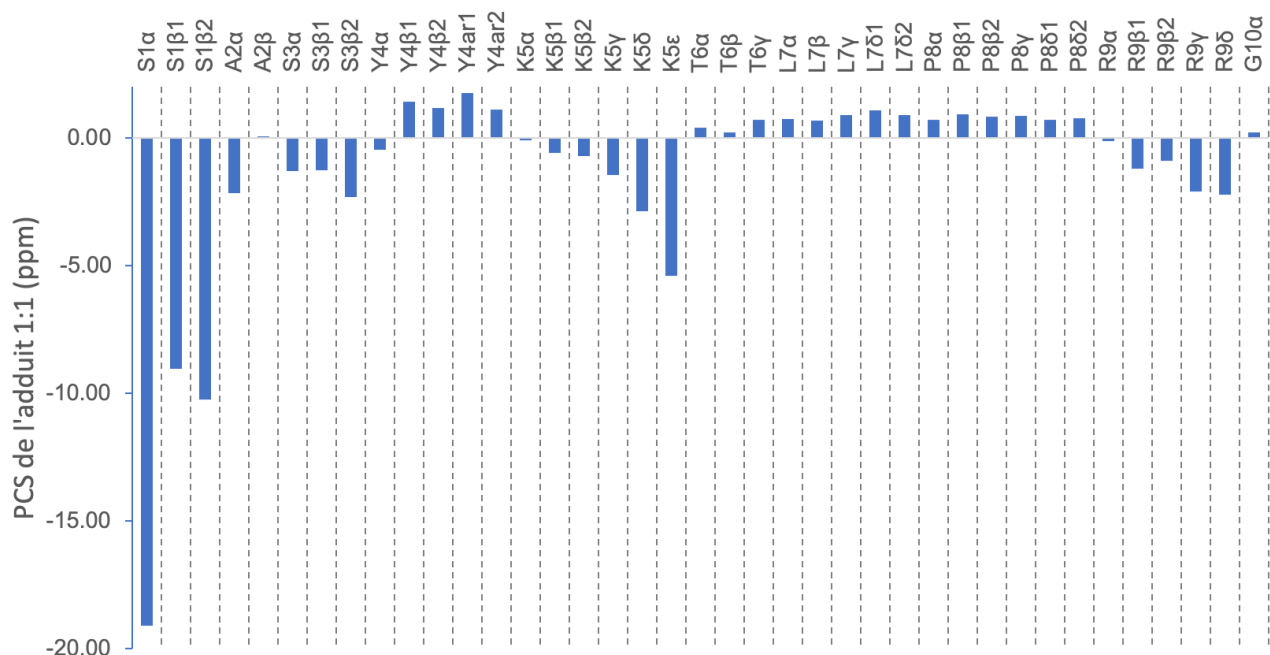


Figure 54 : PCS de chaque proton du peptide SASY, basés sur les valeurs δ^{comp} calculées pour les adduits SASY:[Tb(DPA)₃]³⁻ et SASY:[Y(DPA)₃]³⁻.

Le fort paramagnétisme du Terbium peut affecter les noyaux jusqu'à une distance de 40 Å, des PCS peuvent donc être observés à longue distance.⁷¹ A courte distance le PRE est problématique car les signaux peuvent être si larges qu'il est impossible de les distinguer. A partir de 1 équivalent de [Na]₃[Tb(DPA)₃], le signal du proton S1α est difficilement observable (largeur à mi-hauteur > 100 Hz), et son PCS est alors de -3,6 ppm. Les PCS des protons S1β sont eux aussi très forts, et tout semble indiquer que S1 est fortement impliqué dans l'interaction. L'extrémité de la chaîne latérale de la Lysine K5 semble elle aussi impliquée. Dans une moindre mesure les PCS de la chaîne latérale de R9 et des résidus S3 et Y4 sont significatifs.

Ces résultats sont plutôt en accord avec ce qui était attendu pour ce peptide, les sites d'interaction potentiels étant les groupements amines à charge positive de S1 et des chaînes latérales de K5 et R9, avec éventuellement une participation du groupement aromatique de Y4 par π -stacking. Cependant les PCS de S1 sont significativement plus intenses que ceux de K5 et R9. L'étude des PRE est donc envisagée, dans le but de confirmer les résultats de PCS ou tout du moins d'apporter des informations supplémentaires sur le système.

3.2 PRE (PARAMAGNETIC RELAXATION ENHANCEMENT)

Le PRE est défini comme la variation du temps de relaxation des noyaux induit par la présence d'un centre paramagnétique dans l'échantillon. Il est déterminé expérimentalement en mesurant la relaxation en présence d'un complexe de lanthanide diamagnétique (la vitesse

de relaxation est appelée ρ^{dia}) puis de Gadolinium (III) (la vitesse de relaxation est appelée ρ^{obs}), le PRE étant la différence entre ces 2 valeurs.

Les noyaux observés étant en dehors de la première sphère de coordination du Gadolinium on peut estimer que la relaxation mesurée en l'absence de complexe de lanthanide est une bonne approximation de la relaxation ρ^{dia} . Le PRE peut apporter des informations quantitatives, il dépend de la distance r entre le noyau observé et le centre paramagnétique selon un terme r^{-6} (figure 19).

Une approche qualitative, qui ne nécessite pas de mesure de relaxation, consiste à observer l'atténuation de signaux suite à l'ajout de Gadolinium sur un spectre de type HSQC. Cette approche est choisie pour l'étude du peptide SASY, et des spectres HSQC ^{13}C sont enregistrés pour le peptide seul, à une concentration 1 mM, et en présence de 0,2 et 0,4 équivalents de $[\text{Na}]_3[\text{Gd}(\text{DPA})_3]$ (figure 55).

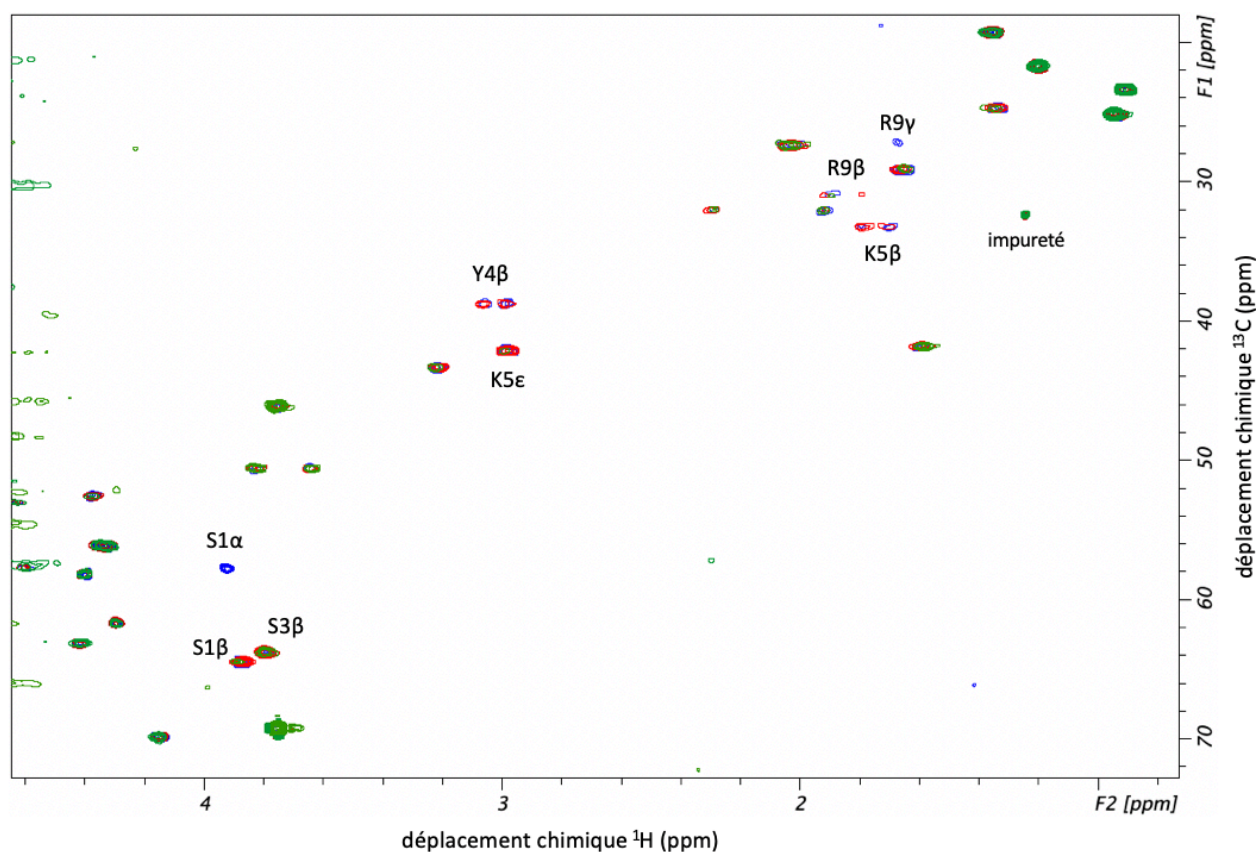


Figure 55 : spectres ^1H - ^{13}C HSQC du peptide SASY seul ($c = 1 \text{ mM}$) (en bleu) et avec 0,2 (en rouge), et 0,4 (en vert) équivalent de $[\text{Na}]_3[\text{Gd}(\text{DPA})_3]$. Les signaux dont l'intensité est le plus fortement atténuée par PRE sont attribués.

Les signaux de S1α et R9γ semblent les plus atténués, suivis par ceux des protons β de Y4, S1, K5 et R9. L'intensité des signaux est alors mesurée et normalisée par rapport au signal du dioxane (intensité = 1) dans chacun de ces 3 spectres. Les rapports d'intensité $I^{\text{para}}/I^{\text{dia}}$

sont représentés pour chaque proton du peptide (figure 56). Les signaux des protons S1 α et R9 γ sont effectivement les plus affectés par le paramagnétisme du Gadolinium, et ce dès 0,2 équivalent. A 0,4 équivalent, la relaxation des protons Y4 β , S1 β , S3 β , Y4 α , K5 δ , K5 ϵ , R9 β et R9 δ est à son tour significativement affectée.

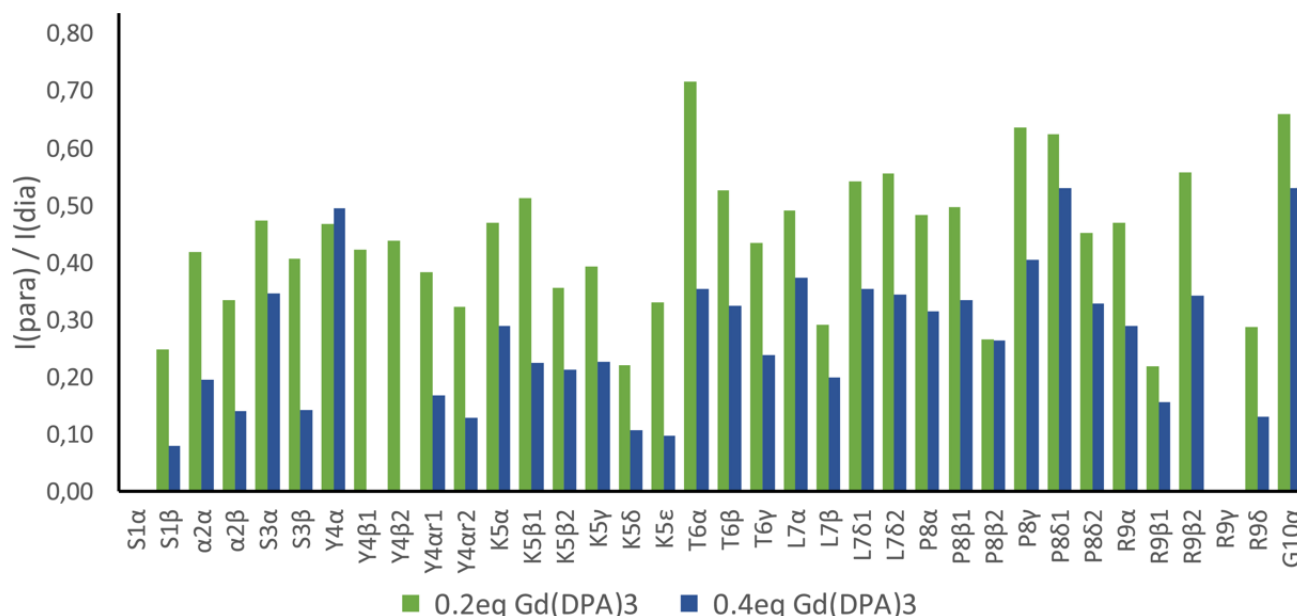


Figure 56 : rapports d'intensité I^{para}/I^{dia} des spectres 1H - ^{13}C HSQC du peptide SASY ($c = 1$ mM) avec 0,2 (en vert) et 0,4 (en bleu foncé) équivalent de $[Na]_3[Gd(DPA)_3]^3$. L'intensité des signaux de SASY en l'absence de complexe de lanthanide est utilisée comme approximation de I^{dia} . Le signal de L7 γ étant faible et superposé avec celui de K5 δ il n'est pas exploité dans ce graphique.

Les résultats des expériences de RMN paramagnétique mettent en évidence plusieurs résidus impliqués dans l'interaction (figure 57). Les résultats sont globalement en accord, mais l'importance de la participation de K5 et R9 à l'interaction reste à confirmer.

- les PCS montrent une forte implication de S1 et de la chaîne latérale de K5. La région S3/Y4 et la chaîne latérale de R9 semblent aussi intervenir, dans une moindre mesure.
- les PRE confirment la forte implication de S1, associé cette fois à la chaîne latérale de R9. La chaîne latérale de K5 et la région S3/Y4 sont impliquées dans une moindre mesure.

Il est important de rappeler que les PCS dépendent de la distance entre le noyau observé et le centre paramagnétique, et de l'orientation du noyau par rapport au tenseur anisotropique du lanthanide. Si le système étudié est dynamique, comme c'est peut-être le cas ici avec un peptide court et intrinsèquement désordonné, l'orientation du peptide et du complexe de lanthanide peut varier durant le temps de l'expérience RMN. Les PCS pouvant être positifs ou négatifs il est possible, pour un système en échange rapide, que la moyenne des PCS observés au cours d'une mesure RMN pour un proton proche du centre paramagnétique soit

nulle. Cette hypothèse pourrait expliquer les différences entre les résultats de PCS et de PRE pour K5 et R9. Des calculs de Modélisation Moléculaire sont donc envisagés en complément des résultats expérimentaux, afin de déterminer si le système est dynamique, et de préciser le mode d'interaction.

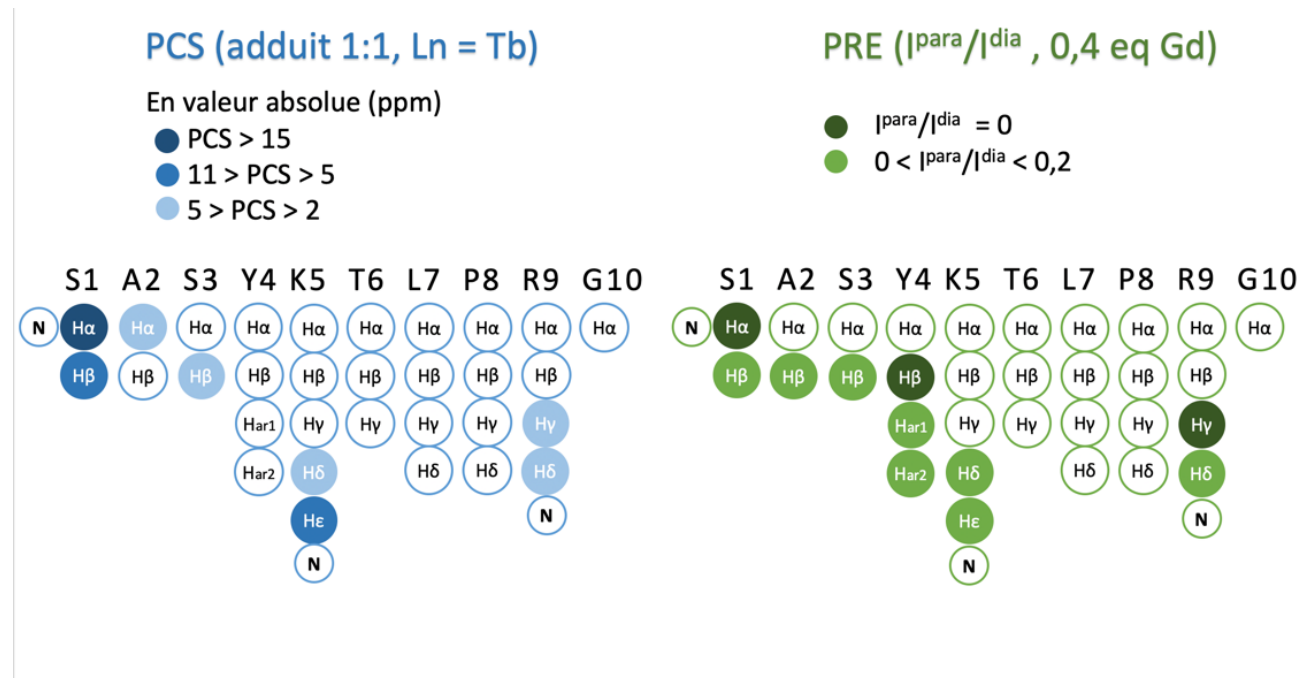


Figure 57 : comparaison des résultats de RMN paramagnétique. Les PCS sont basés sur les valeurs δ^{comp} calculées pour les adduits $SASY:[Tb(DPA)_3]^{3-}$. Les rapports d'intensité I^{para}/I^{dia} des spectres avec 0,4 équivalent de $[Na]_3[Gd(DPA)_3]^{3-}$ sont utilisés pour illustrer les PRE.

4 - MODÉLISATION MOLÉCULAIRE

Des simulations de dynamique moléculaires sont mises en œuvre par l'équipe d'Elise Dumont, au Laboratoire de Chimie. Le même protocole est appliqué au peptide seul et en interaction avec un complexe de lanthanide $[Y(DPA)_3]^{3-}$, dans une boîte d'eau avec des ions Na^+ et Cl^- représentant une concentration 0,2 mol.L⁻¹. Pour le peptide seul, une dynamique de 500 ns ne montre pas de repliement particulier. Pour le système SASY/complexe de lanthanide, 4 dynamiques de 1 μs chacune sont lancées pour chaque énantiomère (Δ et Λ). Une analyse des clusters de ces trajectoires semble indiquer une interaction de $[Y(DPA)_3]^{3-}$ avec les résidus S1, K5 et R9 (figure 58). Les structures les plus probables (46% et 37,4%) montrent une interaction du complexe de lanthanide avec les résidus S1 et R9, les autres structures montrent une alternance de modes d'interaction impliquant S1, K5 et R9 soit seuls, soit par paire.

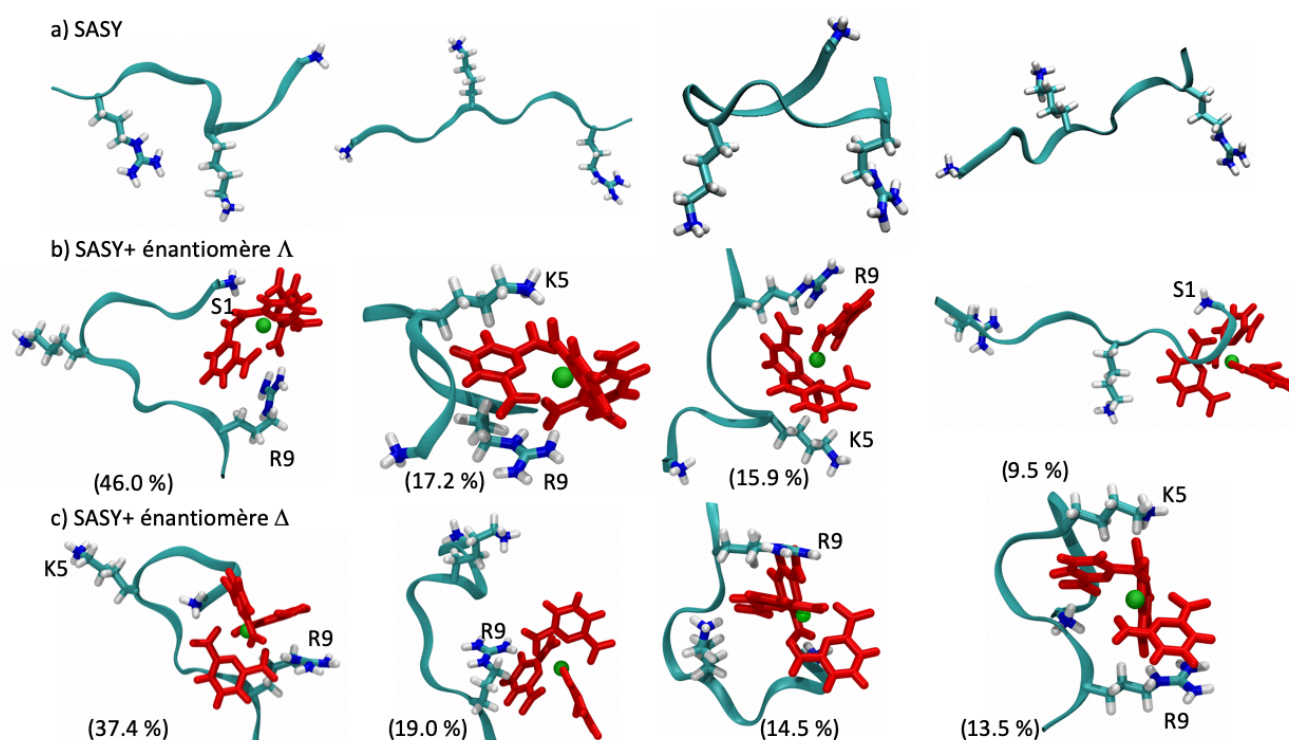


Figure 58 : représentations des structures probables de SASY a) seul, b) en interaction avec l'énantiomère Λ du complexe et c) en interaction avec l'énantiomère Δ du complexe. Les 4 structures les plus peuplées (voir pourcentage entre parenthèses) issues de l'analyse des clusters sont illustrées. Le lanthanide est représenté par une sphère verte, les ligands dipicolinates sont en rouge et le peptide est en bleu.

La représentation de l'évolution de la distance de S1, K5 et R9 par rapport au centre paramagnétique met en évidence cette alternance du mode d'interaction (figure 59). Le système est hautement dynamique et une seule structure (concernant l'énantiomère Λ , population 13,5 %) montre une interaction impliquant les 3 résidus simultanément. Le peptide semble trop court et trop dynamique pour permettre une association stable via les 3 sites d'interaction potentiels avec le complexe.

D'autres interactions non-covalentes intramoléculaires semblent jouer sur le repliement du peptide, notamment un π -stacking entre Y4 et K5 (50% des trajectoires sont concernées) et une liaison hydrogène entre le OH de S1 et les résidus L7 ou T6.

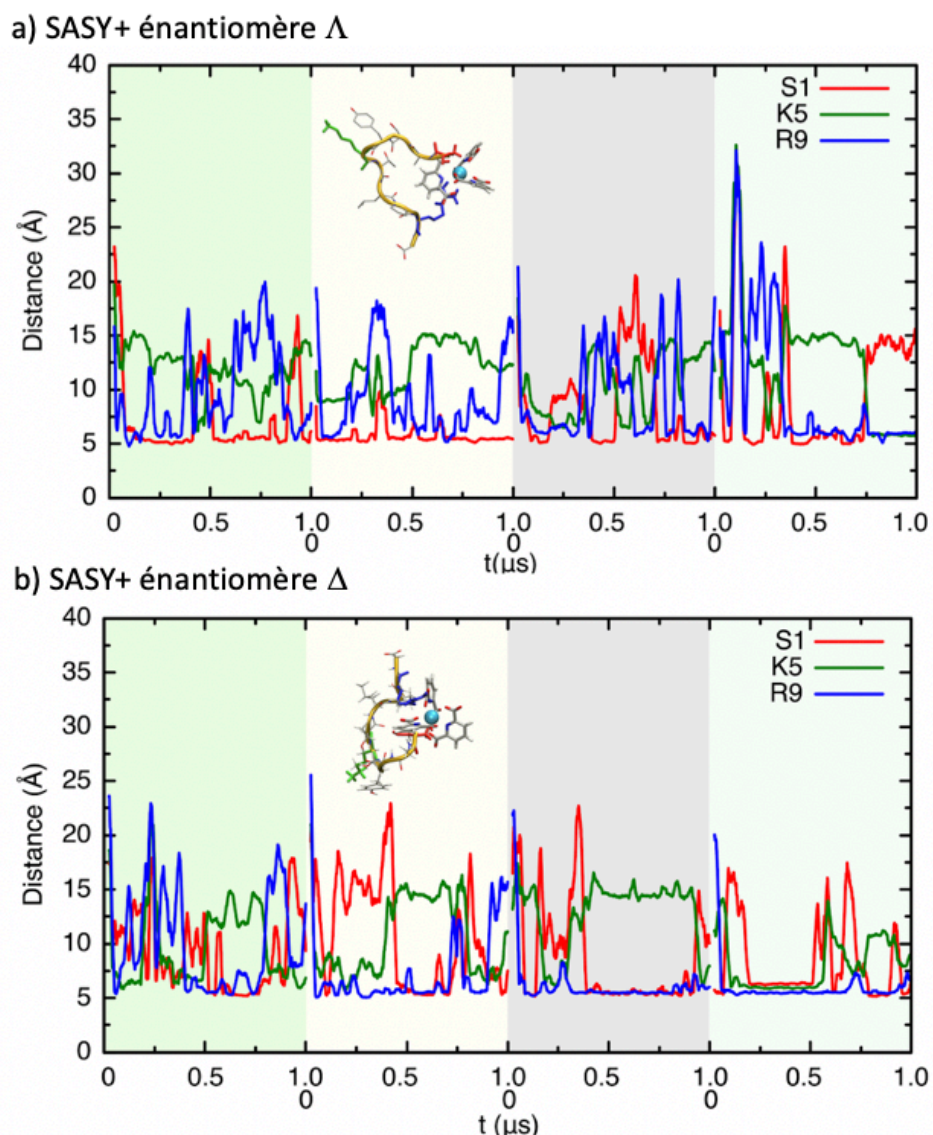


Figure 59 : évolution des distances entre l'ion lanthanide et les centres de masse de S1 (en rouge), K5 (en vert) et R9 (en bleu) de SASY, en interaction avec l'énantiomère Λ du complexe (a) et en interaction avec l'énantiomère Δ du complexe (b).

L'énergie libre absolue est aussi calculée, avec $\Delta G_{bind} = -5.0 \pm 0.6$ kcal.mol⁻¹ pour l'énantiomère Λ et $\Delta G_{bind} = -6.3 \pm 0.7$ kcal.mol⁻¹ pour l'énantiomère Δ . Ces valeurs sont en accord avec les valeurs de K_d déterminées expérimentalement ($K_d = 7$ mMol.L⁻¹ par diffusion et $K_d = 8$ mMol.L⁻¹ par déplacement chimique). Les valeurs de ΔG et K_d sont liées selon l'équation suivante:

$$\Delta G^0 = -RT \ln(1/K_d) \quad \text{Équation 22}$$

Les résultats de dynamique moléculaire confirment une interaction entre SASY et le complexe de lanthanide selon un modèle 1:1, en échange rapide, avec une constante de dissociation de l'ordre du mM. L'implication des résidus S1, K5 et R9 est elle aussi confirmée, et une zone

d'ombre est levée par l'analyse de la corrélation entre (i) les distances peptide-lanthanide calculées et (ii) les distances estimées expérimentalement (figure 60).

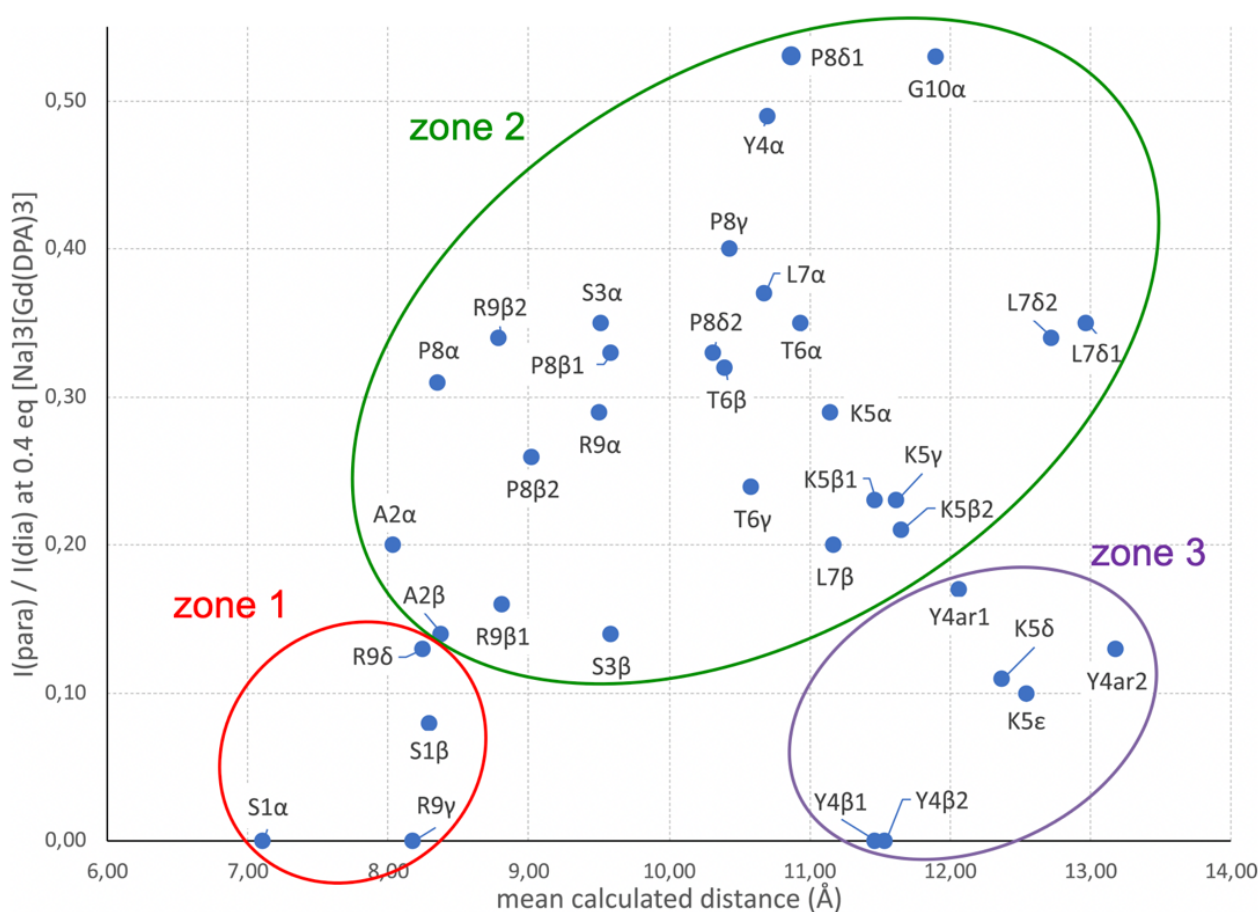


Figure 60 : corrélation entre les distances calculées entre chaque proton de SASY et l'ion Gadolinium et les rapports d'intensités $I^{\text{para}}/I^{\text{dia}}$ mesurés expérimentalement pour 0.4 équivalents de $[\text{Na}]_3[\text{Gd}(\text{DPA})_3]$. 3 zones sont indiquées sur le graphe.

Pour la plupart des protons de SASY la distance calculée est cohérente avec le rapport $I^{\text{para}}/I^{\text{dia}}$. Dans la zone 1 du graphique, l'atténuation est très forte ($I^{\text{para}}/I^{\text{dia}} = 0$) pour les protons impliqués dans l'interaction dans les structures les plus peuplées et donc proches du Gadolinium (7 à 8 Å) : les protons de S1 et de l'extrémité de la chaîne latérale de R9. Dans la zone 2 on retrouve les protons qui ne sont pas impliqués dans l'interaction, pour lesquels la distance calculée augmente avec le rapport $I^{\text{para}}/I^{\text{dia}}$.

La zone 3 du graphique regroupe les protons de l'extrémité de la chaîne latérale de K5 et ceux de Y4, avec une distance calculée élevée (11-13 Å) et un rapport $I^{\text{para}}/I^{\text{dia}}$ faible. Ces résultats peuvent être expliqués par une flexibilité importante de la région Y4-K5 qui explore un vaste espace conformationnel lors des simulations. Au cours d'une mesure RMN, le mode d'interaction alterne et la chaîne latérale de K5 est tantôt impliquée dans l'interaction, tantôt éloignée du Gadolinium. Y4 subit le même phénomène en raison du π -stacking avec K5. Le signal RMN est la moyenne de ces différents états.

5 - CONCLUSION

Un système impliquant un décapeptide, intrinsèquement désordonné, et un complexe de lanthanide paramagnétique $[\text{Ln}(\text{DPA})_3]^{3-}$ est étudié par RMN. Un complexe de Praséodyme (III) est utilisé pour une titration par mesure de diffusion, tandis que des complexes de Terbium (III), d'Yttrium (III) et de Gadolinium (III) sont choisis pour des expériences de RMN paramagnétique. Des calculs de Dynamique Moléculaire sont associés aux données expérimentales RMN (diffusion, PCS et PRE) pour caractériser l'interaction. Il est ainsi possible d'accéder à des phénomènes dynamiques selon deux échelles de temps : les données RMN reflètent la moyenne entre l'état libre et l'état lié, et l'état lié est lui-même la moyenne des différentes conformations de l'adduit, mises en évidence par la dynamique Moléculaire. Cette étude a fait l'objet d'un article, publié en 2021 (en annexe).¹²¹

V - CONCLUSION INTERMÉDIAIRE

Nous avons mis au point une méthode pour analyser le mode d'interaction en solution de complexes de lanthanides utilisés pour la cristallisation de protéines. Cette méthode est basée sur la mesure de diffusion par RMN de ces systèmes qui impliquent des lanthanides paramagnétiques.

Dans un premier temps, la méthode est optimisée sur des systèmes simples $[A]_3[Ln(DPA)_3]$ (avec $A = Na^+$ ou ethylguanidium), ce qui permet d'estimer l'incertitude expérimentale à 1% et d'évaluer l'influence du paramagnétisme du lanthanide sur la mesure de diffusion. Une série de systèmes de paramagnétisme croissants $[EtGua]_3[Ln(DPA)_3]$ avec $Ln = Lu, Sm, Eu, Pr, Yb, Tm, Tb$ ou Dy est testée, et les mesures montrent qu'un temps de relaxation T_1 très court n'empêche pas systématiquement la mesure d'un coefficient de diffusion. Dans les cas limites, où la mesure est affectée par le paramagnétisme, il est possible d'utiliser un équivalent diamagnétique. Une titration par mesure de diffusion permet de caractériser un système dynamique, en échange rapide en solution et de déterminer une valeur de constante de dissociation K_d . Cette étude a fait l'objet d'un article, publié en 2016.¹¹⁷

La méthode est alors appliquée à un système impliquant un complexe de lanthanide et une protéine. Une protéine modèle connue pour co-cristalliser avec le complexe de lanthanide déjà utilisé, est étudiée en solution avec un complexe paramagnétique $[Pr(DPA)_3]^{3-}$. Une titration par mesure de diffusion, basée sur l'observation des signaux du complexe de lanthanide, permet de déterminer une constante de dissociation pour ce système 1:1 en échange rapide. Le choix d'un complexe de Praséodyme (III) permet (i) d'éviter la superposition des signaux du complexe avec ceux de la protéine, pour une meilleure précision de la mesure de diffusion, et (ii) d'observer des variations de déplacements chimiques significatives à faible concentration en complexe pour les expériences de RMN paramagnétiques.

D'autres techniques d'investigation (RMN paramagnétique et Dynamique Moléculaire) sont mises en œuvre pour préciser le mode d'interaction (figure 24). Les données de RMN paramagnétique confirment la constante de dissociation déterminée par mesure de diffusion. L'ensemble des résultats expérimentaux, associés aux calculs, permet de mettre en évidence deux sites d'interaction entre le complexe de Lanthanide et la protéine.

La méthode est ensuite appliquée à un système impliquant un décapeptide, intrinsèquement désordonné. Nous anticipons une interaction dynamique, potentiellement faible et compliquée à mettre en évidence. Un complexe paramagnétique $[Pr(DPA)_3]^{3-}$ est à nouveau choisi pour une titration par mesure de diffusion. Des expériences de RMN paramagnétique complémentaires sont mises en œuvre et des calculs de Dynamique Moléculaire sont associés

aux données expérimentales RMN (diffusion, PCS et PRE) pour caractériser l'interaction. Il est ainsi possible d'accéder à des phénomènes dynamiques selon deux échelles de temps : les données RMN reflètent la moyenne entre l'état libre et l'état lié, et l'état lié est lui-même la moyenne des différentes conformations de l'adduit, mises en évidence par la dynamique Moléculaire.

La mesure de diffusion montre son intérêt comme première étape d'une étude complète par RMN et Modélisation Moléculaire. Cette méthode est appliquée à l'étude de systèmes variés avec des partenaires de tailles très différentes (petite molécule, peptide, protéine), et permet de caractériser l'interaction supramoléculaire entre un complexe de lanthanide paramagnétique et un peptide ou une protéine en solution. Le complexe $[\text{Ln}(\text{DPA})_3]^{3-}$, qui est utilisé en cristallographie des protéines (comme agent de cristallisation et de diffusion anormale) montre ainsi un intérêt supplémentaire pour l'étude de protéine en solution, il est ainsi possible de comparer les structures d'un système protéine/complexe à l'état solide (cristal) et en solution.

VI - APPLICATION À UN SYSTÈME PARAMAGNÉTIQUE

1 - PROBLÉMATIQUE : COMPARAISON D'UN SYSTÈME À L'ÉTAT SOLIDE ET EN SOLUTION

La méthode de mesure de diffusion optimisée dans ces travaux de thèse a été appliquée à divers systèmes étudiés au LCH,¹²²⁻¹²⁵ et notamment à un système impliquant un complexe de lanthanide paramagnétique, dans le cadre d'une collaboration avec le groupe du Dr. Fabrice Pointillart (Université de Rennes).¹²⁶ Le système étudié est basé sur l'interaction de complexes de lanthanide paramagnétiques $[\text{Ln}(\text{hfac})_3]$ ($\text{hfac}^- = 1,1,1,5,5,5\text{-hexafluoroacetylacetonate}$) avec des ligands organiques de type binaphtyl-diphosphate chiraux (figure 61), et présente des propriétés intéressantes en termes de magnétisme et de luminescence selon l'ion lanthanide choisi.¹²⁷ Un ion Dysprosium (III) permet d'obtenir un système faiblement luminescent mais qui présente les propriétés magnétiques d'une molécule-aimant,^{128, 129} tandis qu'un ion Europium (III) donne un système exclusivement luminescent.^{127, 130}

L'analyse par DRX de cristaux obtenus pour un système $[\text{Eu}(\text{hfac})_3]/\text{ligand}$ montre la présence d'un polymère de coordination linéaire dans lequel le ligand diphosphate est pontant (figure 61). Cette structure est en accord avec ce qui a été observé pour un système très similaire en 2017 par l'équipe de Y. Hasegawa.¹³⁰ Cette étude suggérait par ailleurs une structure monomérique en solution, ce qui nous a décidé à mettre en œuvre une étude complète par RMN du système $[\text{Eu}(\text{hfac})_3] + \text{ligand}$ en solution.

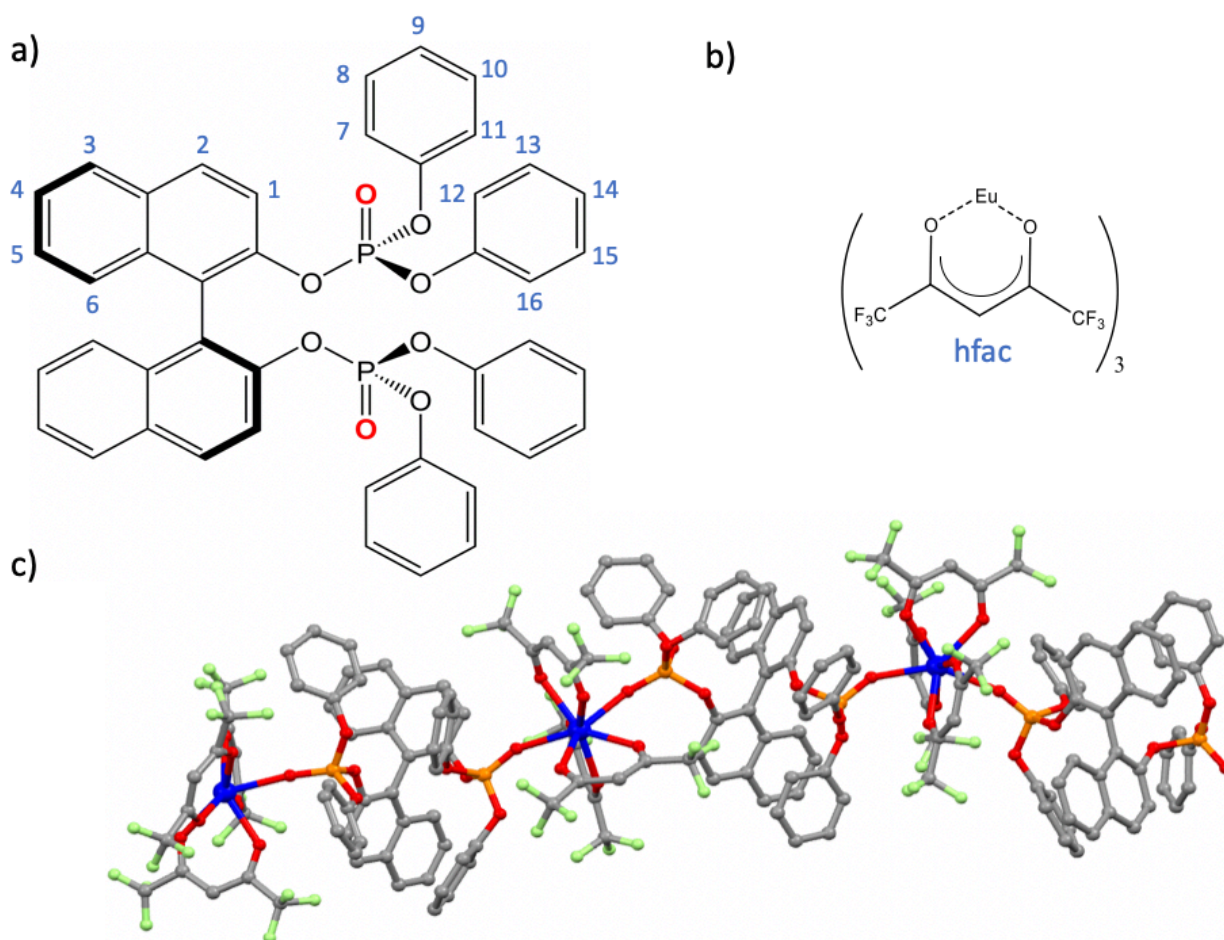


Figure 61 : illustration du système à base d'Europium (III). a) formule de l'énantiomère **S** du ligand **L** (appelé par la suite **(S)-L**) b) formule du complexe $[Eu(hfac)_3]$ (appelé par la suite **[(S)-2]**) c) structure du système sous sa forme solide : on observe dans le cristal un polymère linéaire $[Eu(hfac)_3-S]_n$ (appelé par la suite **[(S)-2]_n**).

Trois systèmes énantiopurs sont synthétisés à partir du ligand **(S)-L** pour être étudié par RMN en solution : **[(S)-1]_n** avec un ion Dysprosium (III), **[(S)-2]_n** avec un ion Europium (III) et **[(S)-3]_n** avec un ion Yttrium (III). La mesure de diffusion du système, ainsi que la mesure des PCS couplée à une étude de Modélisation Moléculaire, vont permettre de caractériser la structure en solution et de déterminer si le système est observé sous forme de monomères ou d'oligomères.

2 - MESURE DE DIFFUSION

Trois échantillons sont préparés pour une mesure de diffusion par RMN : le ligand **(S)-L** et les systèmes **[(S)-2]_n** et **[(S)-3]_n**. Comme vu dans les chapitres précédents, le fort paramagnétisme de l'ion Dysprosium peut être un problème pour ce type de mesure (cf tableau 3) et le composé **[(S)-1]_n** est donc écarté de cette partie de l'étude RMN. Les composés sont solubilisés dans un solvant organique ($CDCl_3$), et des tubes RMN de diamètre

3 mm sont utilisés pour éviter les problèmes de convection dus à la faible viscosité du solvant.¹⁰⁶ Les spectres 1D ^1H de $[(\text{S})\text{-2}]_n$ et $[(\text{S})\text{-3}]_n$ solubilisés sont bien résolus, les signaux sont beaucoup plus fins que ce qui est attendu pour un polymère et qualitativement ceci pourrait indiquer une forme monomérique, ou oligomérique avec un petit nombre d'unités (figure 62). Nous décidons de désigner ces composés en solution par $[(\text{S})\text{-2}]$ et $[(\text{S})\text{-3}]$, en faisant l'hypothèse d'un monomère.

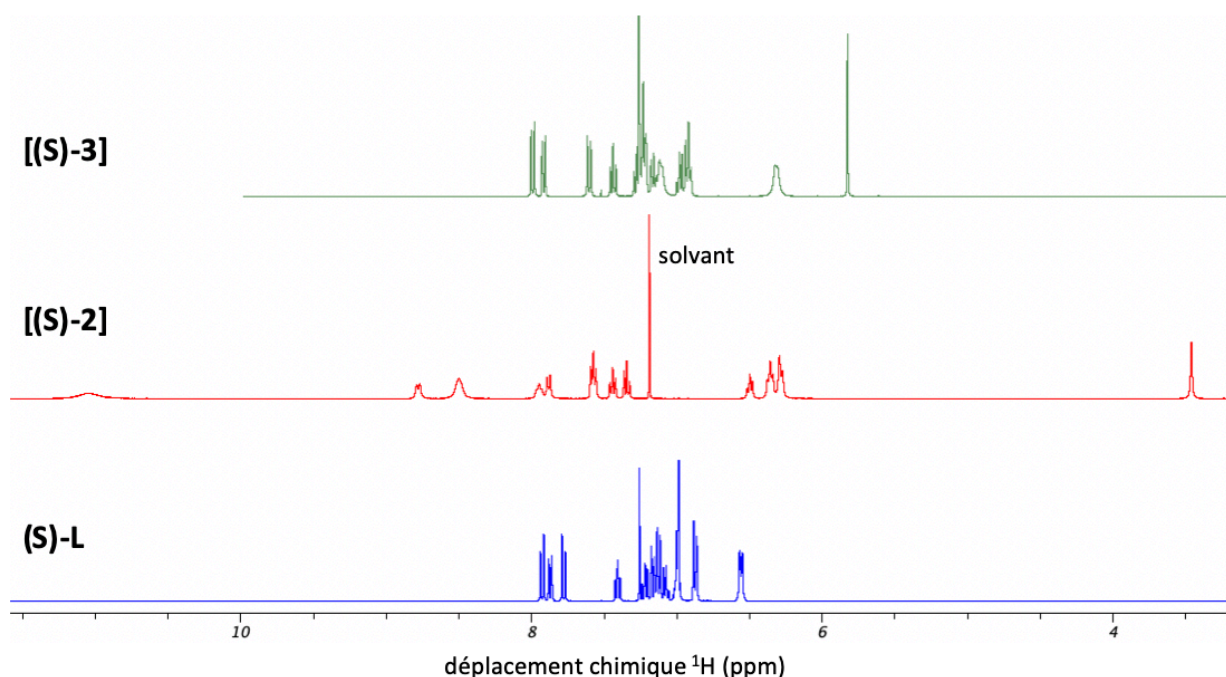


Figure 62 : spectres RMN ^1H en solution du ligand **(S)-L** (en bas) et des systèmes $[(\text{S})\text{-2}]$ (au milieu) et $[(\text{S})\text{-3}]$ (en haut).

La mesure de diffusion est optimisée et un coefficient de diffusion est déterminé pour chaque proton de chaque système. La moyenne de ces valeurs donne un coefficient de diffusion $D_{(\text{S})\text{-L}} = 760 \pm 8 \mu\text{m}^2.\text{s}^{-1}$ pour le ligand libre, $D_{[(\text{S})\text{-2}]} = 675 \pm 8 \mu\text{m}^2.\text{s}^{-1}$ et $D_{[(\text{S})\text{-3}]} = 673 \pm 8 \mu\text{m}^2.\text{s}^{-1}$ pour les complexes. Le coefficient de diffusion du signal résiduel de solvant sert de référence interne, il est similaire dans les trois échantillons (respectivement $D_{\text{CDCl}_3} = 2360 \pm 24 \mu\text{m}^2.\text{s}^{-1}$, $2370 \pm 24 \mu\text{m}^2.\text{s}^{-1}$ et $2350 \pm 24 \mu\text{m}^2.\text{s}^{-1}$).

L'équation de Stokes-Einstein définit le coefficient de diffusion D d'un soluté comme issu du mouvement brownien d'une sphère pleine de rayon hydrodynamique r dans un fluide de viscosité η à une température T , avec k_B la constante de Boltzmann et f le facteur de friction.

$$D = \frac{k_B T}{6\pi\eta r f} \quad \text{Équation 23}$$

Le rayon hydrodynamique donne une indication sur la taille du soluté, avec une approximation sur sa forme, la plupart des solutés n'étant pas des sphères parfaites. Il permet ainsi d'estimer la masse du soluté, avec là aussi une approximation qui ne prend pas

en compte la diversité de densité des différents atomes. Plusieurs stratégies permettent d'estimer la masse d'un soluté à partir de son coefficient de diffusion, ces stratégies donnent des résultats peu précis ou demandent certains prérequis pour obtenir une bonne précision (par exemple connaître la forme du soluté ou établir des courbes de calibration externes avec des composés de taille connue).^{87, 88, 90, 131, 132}

Ainsi, l'équipe de G.A. Morris propose une méthode de calcul permettant de calculer le coefficient de diffusion d'un soluté de masse connue avec une précision de 15%, applicable dans divers solvants organiques, quelle que soit la forme du soluté, tant que sa masse est inférieure à 1500 g.mol⁻¹.^{86, 133} Cette méthode est basée sur l'équation suivante :

$$D = \frac{k_B T \left(\frac{3\alpha}{2} + \frac{1}{1+\alpha} \right)}{6\pi\eta \sqrt[3]{\frac{3MW}{4\pi\rho_{eff}N_A}}} \quad \text{Équation 24}$$

avec $\alpha = \frac{r_s}{r} = \sqrt[3]{\frac{MW_s}{MW}}$ (MW et MW_s sont les masses du soluté et du solvant). La densité effective ρ_{eff} est établie à 627 kg.m⁻³ à partir de plus de 500 mesures expérimentales de diffusion pour des solutés de tailles diverses dans des conditions expérimentales (solvant, température...) variables.

Les molécules utilisées pour ajuster l'équation 24 ne comportent pas d'atomes plus lourds que le Chlore. Cette approximation peut impacter le calcul et sous-estimer la diffusion pour des systèmes impliquant des Lanthanides. Nous avons observé précédemment un coefficient de diffusion similaire pour une série de complexes de tris-dipicolinate, dont la masse varie entre 636 et 670 g.mol⁻¹ selon le lanthanide (voir tableau 3). Dans le cas de ce type de complexes de coordination la densité de l'ion Lanthanide (III) impacte probablement la relation entre la masse du système et son rayon hydrodynamique. Cependant, au vu de la masse du ligand **(S)-L** (MW = 751 g.mol⁻¹) et du complexe de Lanthanide (MW = 1524 g.mol⁻¹ pour **[(S)-2]**, MW = 3048 g.mol⁻¹ pour **[(S)-2]₂** ...) une telle approximation devrait être suffisante pour déterminer le degré d'oligomérisation de l'espèce en solution.

Cette équation est utilisée pour calculer les coefficients de diffusion du ligand **(S)-L** et des espèces monomériques ou dimériques **[(S)-1]**, **[(S)-1]₂**, **[(S)-2]**, **[(S)-2]₂**, **[(S)-3]** et **[(S)-3]₂** (tableau 5). Pour le ligand **(S)-L** D_{calc} montre un très bon accord avec la valeur expérimentale D_{obs} (respectivement 753 et 760 μm².s⁻¹). Pour **[(S)-2]_n** et **[(S)-3]_n** la diffusion est ralentie par rapport à celle du ligand, ce qui valide la présence d'un adduit de masse molaire plus élevée. Les valeurs mesurées par RMN sont supérieures aux valeurs calculées pour un monomère. Ce résultat suggère que l'espèce présente en solution est un monomère. En effet, tout autre oligomère présenterait une masse plus élevée, ce qui impliquerait une diffusion encore plus lente et nous écartons donc cette hypothèse. En présence d'atomes lourds la valeur de ρ_{eff} utilisée est inadéquate et les coefficients de diffusion calculés sont sous-estimés, ce qui explique l'écart entre les valeurs expérimentales

et les valeurs calculées par l'équation 24. On remarque que **[(S)-2]** et **[(S)-3]** diffusent à la même vitesse malgré une différence de masse de 52 g.mol⁻¹. Le rayon hydrodynamique du système varie en effet peu selon l'ion présent dans le complexe. On estime donc que **[(S)-1]**, dont nous n'avons pas mesuré la diffusion par RMN, est lui aussi présent sous forme de monomère en solution.

	(S)-L	[(S)-1]_n		[(S)-2]_n		[(S)-3]_n	
		n = 1	n = 2	n = 1	n = 2	n = 1	n = 2
<i>MW</i>	751	1534	3068	1524	3048	1461	2922
<i>D_{calc}</i> (μm ² .s ⁻¹)	753 ± 113	544 ± 82	405	547 ± 82	406	557 ± 84	414
<i>D_{obs}</i> (μm ² .s ⁻¹)	760 ± 8	nd		675 ± 8		673 ± 8	

*Tableau 5 : comparaison des coefficients de diffusion mesurés en solution (*D_{obs}*) et calculés (*D_{calc}*). Pour les polymères solubilisés des coefficients de diffusion ont été calculés pour un monomère ou un dimère. Les valeurs *D_{calc}* sont exprimées avec une incertitude de 15% pour les monomères. L'incertitude n'est pas estimée pour les dimères car leurs masses est en dehors de la gamme de validité de la méthode.¹³³*

La mesure de diffusion par RMN des polymères **[(S)-1]_n**, **[(S)-2]_n** et **[(S)-3]_n** confirme l'hypothèse de leur dissociation sous forme de monomères quand ils sont solubilisés dans un solvant organique. Des expériences de RMN paramagnétiques sont alors mises en œuvre afin d'étudier plus précisément la structure de ces monomères en solution.

3 - RMN PARAMAGNÉTIQUE

3.1 ATTRIBUTION DES SPECTRES ¹H

Dans un premier temps les systèmes diamagnétiques (**(S)-L** et **[(S)-3]**) ou faiblement paramagnétiques (**[(S)-2]**) sont étudiés par RMN. L'analyse des spectres ¹H (figure 62) montre une symétrie du ligand. Des expériences 2D COSY et ¹³C HSQC sont enregistrées afin de compléter l'attribution des spectres ¹H (figure 63).

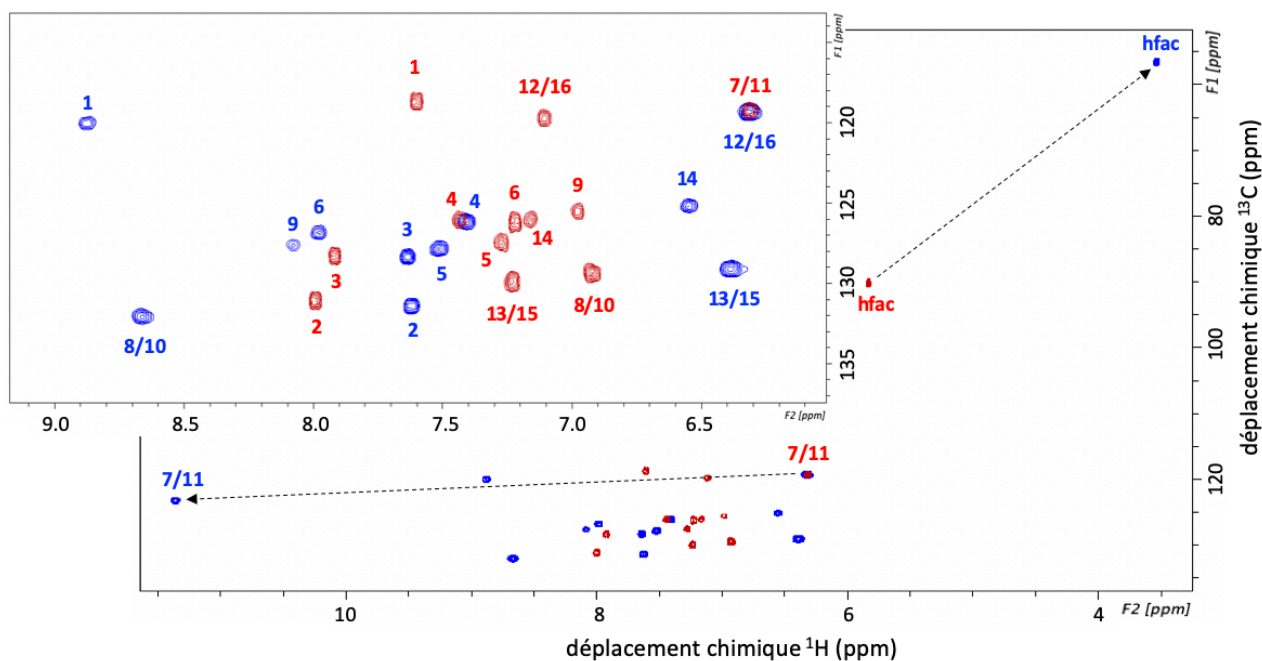


Figure 63 : spectres ^1H - ^{13}C HSQC de **[(S)-2]** (en bleu) et **[(S)-3]** (en rouge) avec un agrandissement de la région entre 10 et 6 ppm dans la dimension ^1H (encadré). Les signaux sont attribués selon la numérotation proposée Figure 61.

Le spectre ^1H de **[(S)-1]** montre la même symétrie (figure 64) et deux signaux sont particulièrement affectés par le paramagnétisme du Dysprosium (III).

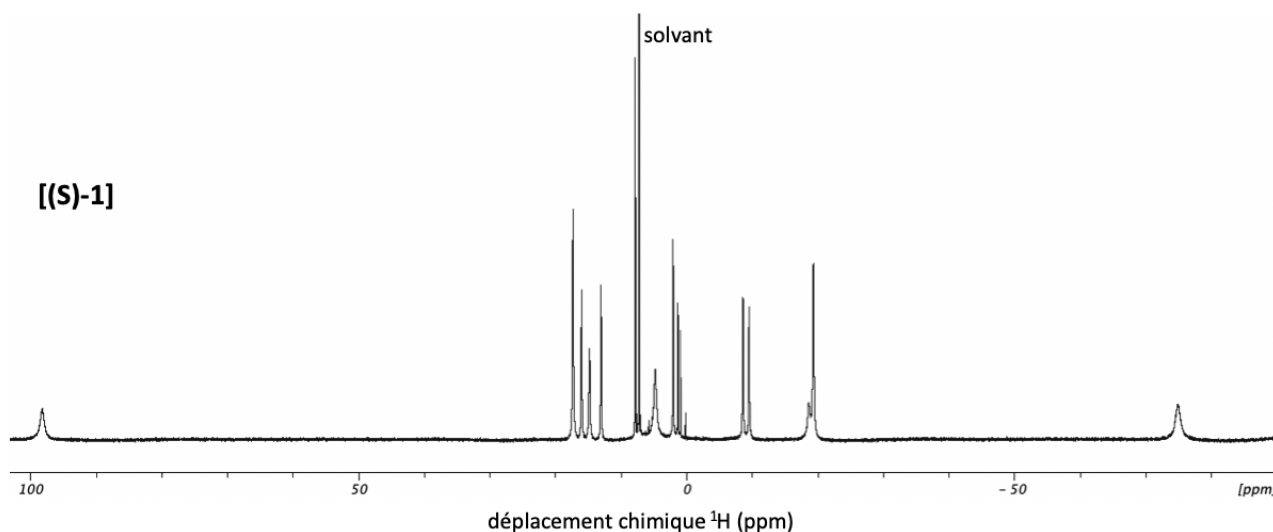


Figure 64 : spectre $1\text{D } ^1\text{H}$ de **[(S)-1]** (en solution dans CDCl_3) montrant deux signaux fortement décalés à 98,2 ppm et -75,0 ppm

Des expériences de mesure de relaxation T_1 sont mises en œuvre pour attribuer les signaux de **[(S)-1]** (tableau 6). La relaxation est affectée par le paramagnétisme de l'ion Lanthanide (III) et plus un proton est proche du centre paramagnétique plus il relaxe rapidement. Nous faisons l'hypothèse que les 3 adduits ont une structure similaire en solution, quel que soit

l'ion central du complexe. Dans ce cas il est possible de corréler les temps de relaxation mesurés pour **[(S)-1]** et **[(S)-2]**. Les protons de **[(S)-2]** qui relaxent les plus vite en présence d'un ion Europium (III) sont attribués aux protons des ligands hfac du complexe et aux protons 1, 7/11 et 12/16 du ligand diphosphate. L'analyse des temps de relaxation T_1 de **[(S)-1]** met en évidence quatre signaux qui relaxent particulièrement rapidement : ils sont donc attribués aux protons hfac, 1, 7/11 et 12/16. La même analyse est faite pour les autres signaux. La mesure de relaxation ne suffit pas à attribuer tous les signaux de **[(S)-1]** et doit être complétée par l'analyse des PCS.

Proton	(S)-L	[(S)-3]	[(S)-2]	[(S)-1]
1	2200	1390	225	3
2	1350	1020	603	9
3	1390	1030	875	33
4	1450	1100	1072	80
5	1500	1340	1050	72
6	1840	*	1000	23
7/11	3400	1950	140	<1
8/10	3100	1800	748	10
9	3100	1800	1280	24
12/16	3500	*	313	<1
13/15	3000	*	858	15
14	3500	*	1580	32
hfac	no	1860	221	<1

Tableau 6 : relaxation T_1 ^1H (en ms) pour les différents systèmes **(S)-L**, **[(S)-1]**, **[(S)-2]** et **[(S)-3]** (en solution dans CDCl_3). Certaines valeurs n'ont pu être déterminées en raison de la superposition de signaux et sont signalées par un astérisque.

Les PCS sont mesurés comme défini précédemment (Equation 9) avec **[(S)-3]** comme système diamagnétique. L'attribution des signaux de **[(S)-2]** étant complète, il est possible alors d'attribuer les signaux de **[(S)-1]** grâce à une méthode comparative à deux lanthanides décrite par l'équipe de L. Di Bari.¹³⁴ Cette méthode est applicable (i) pour deux complexes isostructuraux avec deux ions lanthanides paramagnétiques et (ii) s'il est possible de négliger les FCS, ce qui permet d'utiliser l'approximation $\delta^{\text{para}} = \text{PCS}$. Le graphe représentant $\delta^{\text{para}}(\text{Ln}_1)$ en fonction de $\delta^{\text{para}}(\text{Ln}_2)$ montre alors une droite passant par l'origine.

Les δ^{para} observés pour **[(S)-1]** sont proportionnels aux δ^{para} de **[(S)-2]** et de signes opposés, en accord avec les tenseurs anisotropiques du Dysprosium (III) et de l'Europium (III) (figure 19). Par exemple, on observe un fort δ^{para} positif pour les protons 7/11 de **[(S)-2]**, on s'attend donc à observer un fort δ^{para} négatif pour ces mêmes protons en présence de Dysprosium (III) (espèce **[(S)-1]**). Les temps de relaxation T_1 permettent de confirmer l'attribution, ces protons sont ceux qui relaxent le plus rapidement en présence d'Europium (III), et c'est aussi le cas en présence de Dysprosium (III) (tableau 6). L'analyse en parallèle

des temps de relaxation T_1 , de l'attribution des signaux de **[(S)-2]**, et des PCS de **[(S)-1]** et **[(S)-2]** permet de proposer une attribution pour les signaux de **[(S)-1]** (figure 65).

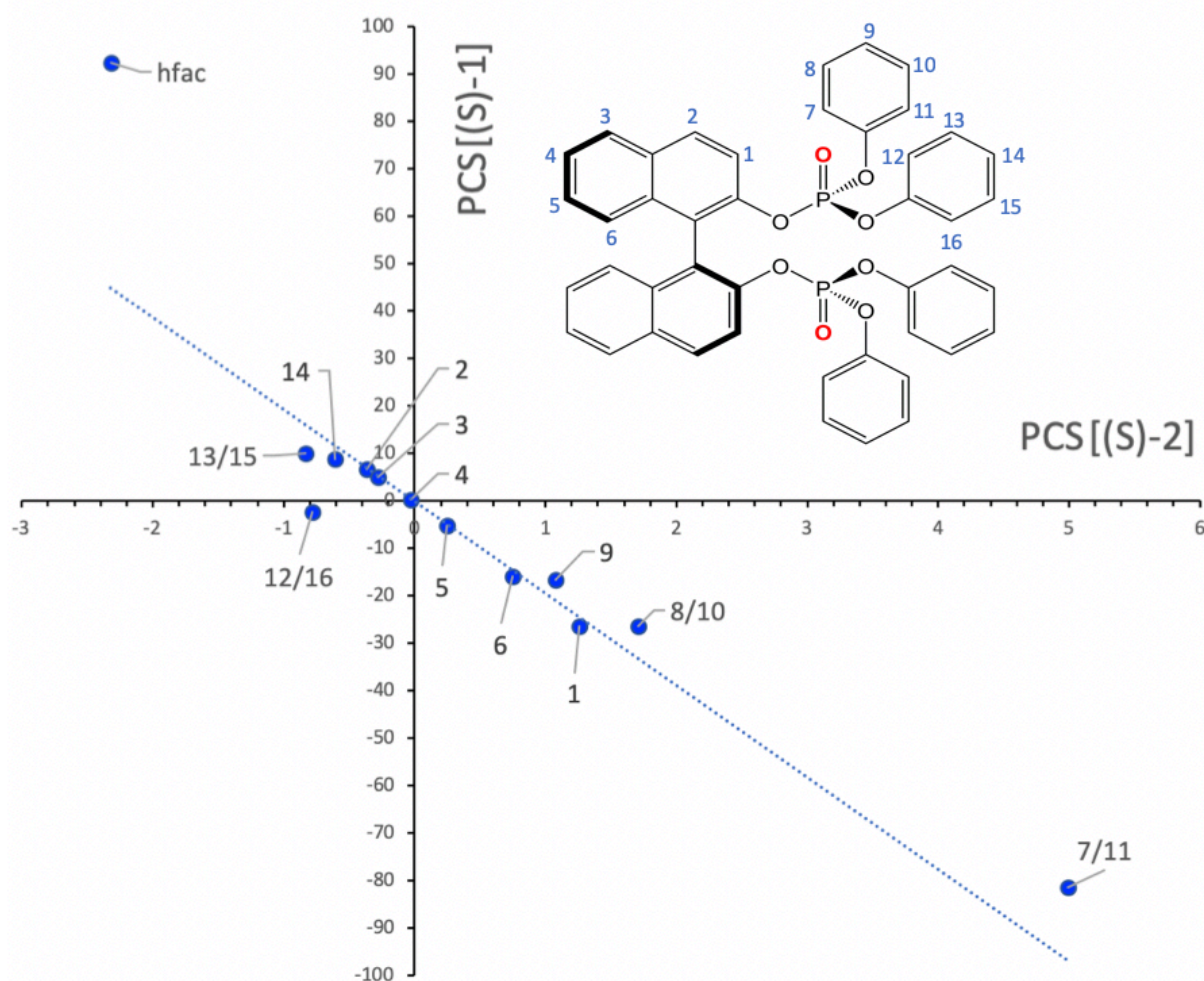


Figure 65 : comparaison des PCS mesurés pour **[(S)-1]** et **[(S)-2]**. Pour ce graphique on fait l'approximation $PCS = \delta^{para}$ pour tous les protons.

L'attribution proposée montre une bonne corrélation des PCS de **[(S)-1]** et **[(S)-2]**, à l'exception du signal du ligand hfac du complexe, noté hfac sur le graphique. Ces protons ne satisfont pas le second critère de validité de la méthode utilisée : ils sont très proches du Dysprosium, à trois liaisons de distance du lanthanide, et il n'est donc pas possible de négliger la contribution du contact de Fermi (FCS) au δ^{para} . On observe aussi une légère déviation des corrélations attribuées aux deux groupements phenyls du ligand par rapport à la droite, plus particulièrement les protons ortho (7/11 et 12/16). Un tel écart peut être attribué aux approximations impliquées par la méthode, le FCS n'étant peut-être pas négligeable pour ces protons.

3.2 MODÉLISATION MOLÉCULAIRE

La structure du monomère **[(S)-1]** en solution est optimisée par des simulations numériques basée sur la méthode de la fonctionnelle de densité (DFT, Density Functional Theory) (figure 66a). Les déplacements chimiques de **[(S)-1]** et **[(S)-3]** sont ensuite calculés à partir de la structure déterminée, ce qui permet de calculer les PCS pour **[(S)-1]**.

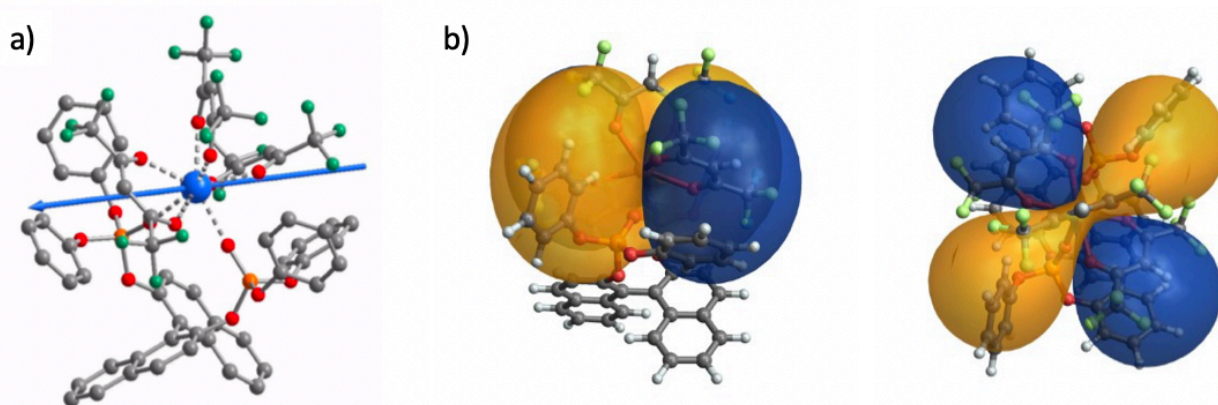


Figure 66 : a) structure optimisée par DFT de **[(S)-1]** en solution. L'ion Dysprosium (III) et l'orientation de l'axe magnétique principal sont représentés par une sphère (et une flèche) bleue. b) isosurfaces décrivant les PCS induits par l'ion Dysprosium (III). Les surfaces colorées représentent les régions de PCS de 20 ppm, positifs (en bleu) et négatifs (en orange).

Les valeurs de PCS calculées sont alors comparées aux données expérimentales afin de valider la structure (figure 67). Le calcul surestime les PCS du système, plus particulièrement pour les protons des groupements phenyls du ligand. Cependant, si l'on observe la tendance générale (le signe des PCS et leur intensité relative d'un proton à l'autre), les PCS calculés sont en accord avec les PCS mesurés par RMN. L'écart significatif entre les valeurs numériques peut être expliqué par la dynamique du système en solution. Le PCS peut être positif ou négatif en fonction de l'orientation du ligand par rapport au centre paramagnétique, et son intensité varie selon la distance par rapport à l'ion Lanthanide (III) (figure 66b). Une libre rotation des groupements phenyls en solution est tout à fait probable, et donnerait lieu à un PCS moyen reflétant les différentes conformations du ligand pendant la durée de l'expérience RMN. *A contrario* le calcul DFT découle d'une image statique du système.

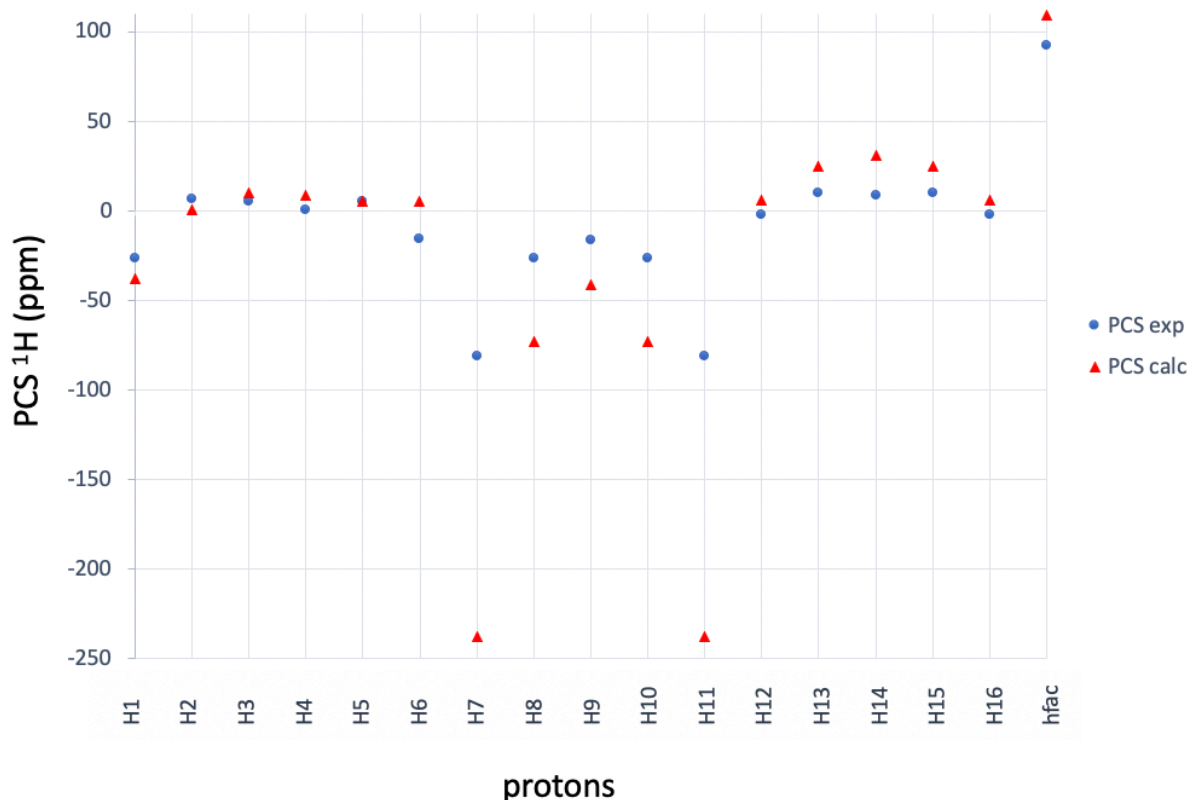


Figure 67 : comparaison des PCS calculés (triangles rouges) et expérimentaux (ronds bleus) obtenus pour **[(S)-1]** en solution.

4 - CONCLUSION

La méthode de mesure de diffusion optimisée précédemment sur des systèmes biologiques est appliquée à l'étude d'un système composé d'un complexe paramagnétique $[\text{Ln}(\text{hfac})_3]$ en interaction avec un ligand organique. Ce système se présente sous la forme d'un polymère de coordination linéaire à l'état solide (sa structure est résolue par DRX) et semble être sous une autre forme, de plus petite taille, en solution. La diffusion des systèmes comportant un ion Europium (III) ou Yttrium (III), mesurée par RMN, montre en effet une forme monomérique. Un troisième système, avec un ion Dysprosium (III) fortement paramagnétique, permet d'exploiter les PCS et les mesures de relaxations T_1 pour caractériser l'interaction. Les PCS sont calculés par DFT et une structure est proposée pour l'adduit 1 : 1 en solution qui peut être comparée à la structure du polymère dans le cristal.

VII - CONCLUSION GÉNÉRALE - PERSPECTIVES

Nous avons mis au point une méthode pour analyser le mode d'interaction en solution de complexes de lanthanides $[\text{Ln}(\text{DPA})_3]^{3-}$ utilisés pour la cristallisation de protéines. Cette méthode est basée sur la mesure de diffusion par RMN de ces systèmes qui impliquent des lanthanides paramagnétiques. Cette méthode est appliquée à l'étude de systèmes variés impliquant un complexe de lanthanide en interaction avec des partenaires de tailles et de flexibilités très différentes (ligand organique, peptide, protéine). Elle permet d'obtenir des informations variées sur une interaction supramoléculaire en solution (constante de dissociation, présence de plusieurs systèmes en échange, dynamique de l'interaction, nombre de partenaires impliqués dans l'adduit...).

La mesure de diffusion montre son intérêt comme première étape d'une étude complète par RMN, en exploitant le paramagnétisme du système. Des calculs de Modélisation Moléculaire complètent l'étude et l'analyse conjointe des résultats de RMN et de MM donne une vision à la fois plus globale et plus précise des mécanismes de l'interaction (dynamique selon plusieurs échelles de temps, sites d'interactions, comparaison avec les structures à l'état solide quand elles sont disponibles...).

Le complexe $[\text{Ln}(\text{DPA})_3]^{3-}$, qui est utilisé en cristallographie des protéines (comme agent de cristallisation et de diffusion anormale) montre un intérêt supplémentaire pour l'étude de protéines en solution, il est ainsi possible de comparer les structures d'un système protéine/complexe à l'état solide (cristal) et en solution. Cependant ce complexe n'est pas le meilleur candidat pour les applications biologiques. De nouveaux complexes de lanthanide, regroupés sous le terme de cristallophore, ont été mis au point dans l'équipe.¹³⁵

Le premier complexe de cette famille est un très bon agent nucléant qui induit des conditions de cristallisation uniques. Le mécanisme d'interaction entre le cristallophore et la protéine reste assez obscur, le cristallophore n'étant pas retrouvé dans le cristal. Il serait donc intéressant d'étudier par RMN en solution les premières étapes de l'interaction dans le milieu de cristallisation. Le spectre RMN ^1H du cristallophore est bien plus complexe que celui de $[\text{Ln}(\text{DPA})_3]^{3-}$ et les premiers résultats avec une protéine modèle semblent indiquer une interaction plus faible. Une étude complète par mesure de diffusion, RMN paramagnétique et Modélisation Moléculaire est prévue pour caractériser plus finement le système en solution.

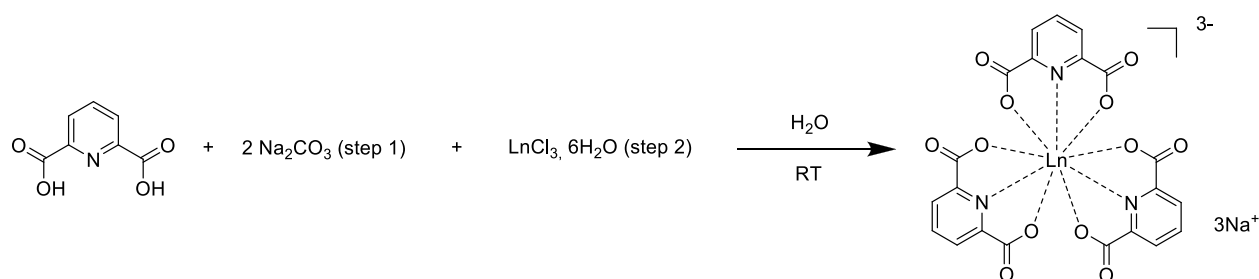
Une fois l'interaction entre le cristallophore et une protéine modèle caractérisée nous envisageons l'étude d'un autre système d'intérêt biologique. En effet, des tests préliminaires semblent indiquer que le cristallophore impacte l'agrégation de peptides β -amyloïdes en solution (résultats non publiés). Cette interaction semble faible et très dynamique, les peptides β -amyloïdes étant, comme le peptide SASY, intrinsèquement désordonnés. Une

étude par mesure de diffusion combinée à de la RMN paramagnétique pourrait apporter de nombreuses informations sur cette interaction en solution. L'agrégation des peptides β -amyloïdes est impliquée dans le développement de la maladie d'Alzheimer (figure 1) et le cristallore, par son interaction avec les peptides, pourrait ouvrir la voie à de nouvelles pistes thérapeutiques.

VIII - MATÉRIEL ET MÉTHODES

1 - PRÉPARATION DES ÉCHANTILLONS

1.1 SYNTHÈSE DES COMPLEXES DE LANTHANIDES



Du carbonate de sodium est mélangé lentement à une suspension aqueuse d'acide dipicolinique. On ajoute ensuite une solution de $\text{LnCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ et on fait chauffer le mélange à reflux. On observe alors la formation rapide de cristaux incolores qui sont filtrés après refroidissement. La poudre cristalline est recristallisée deux fois dans de l'eau, puis séchée sous vide. Le rendement est de 35 à 55%.

1.2 RÉFÉRENCE INTERNE

Du 1,4-dioxane est utilisé comme référence interne. Une solution mère 1 M dans D_2O est préparée et sera ajoutée à chaque échantillon.

1.3 TAMPON

Le tampon tris, utilisé pour les échantillons de protéine dans d'autres études,^{73, 120, 136} semble interagir avec le complexe de lanthanide et avec le système peptide-complexe (figure 68). Nous avons décidé de ne pas étudier cette interaction à 3 partenaires et avons changé de tampon (tampon phosphate salin : PBS).

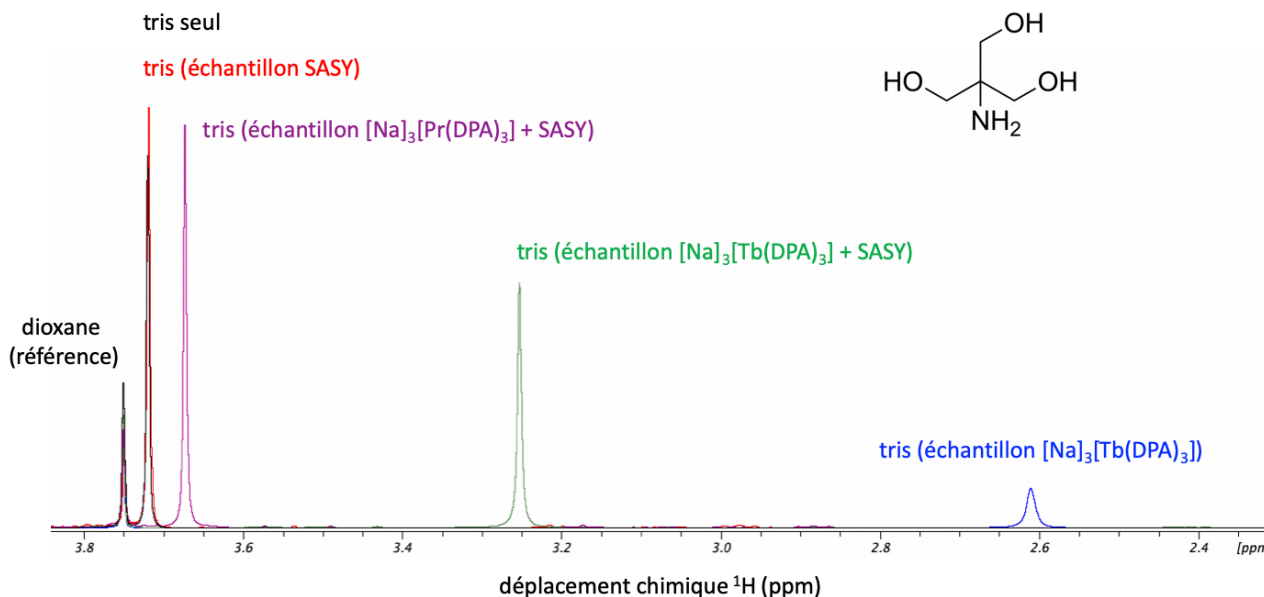


Figure 68 : spectres RMN ^1H de divers échantillons en solution dans du tampon tris ($c = 20 \text{ mM}$, $\text{pH} = 7$, 10% D_2O). Le déplacement chimique du signal du tris varie selon la composition de l'échantillon : tampon tris seul (en noir), peptide SASY dans du tampon tris (en rouge), peptide SASY en présence de $[\text{Na}]_3[\text{Pr}(\text{DPA})_3]$ dans du tampon tris (en violet), peptide SASY en présence de $[\text{Na}]_3[\text{Tb}(\text{DPA})_3]$ dans du tampon tris (en vert), $[\text{Na}]_3[\text{Tb}(\text{DPA})_3]$ dans du tampon tris (en bleu).

2 - EXPÉRIENCES RMN

Les expériences RMN sont réalisées sur un spectromètre Bruker Avance II 500 MHz équipé d'une sonde inverse TXI $^1\text{H}/^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ et sur un spectromètre Bruker Avance III 400 MHz équipé d'une sonde froide Prodigy. Pour toutes les expériences la température est réglée à 298K. Le logiciel Topspin de Bruker (version 3.5 ou 3.6) est utilisé pour l'acquisition et le traitement des données.

2.1 CHAPITRE II : MÉTHODOLOGIE

2.1.1 Mesure de diffusion

La séquence Bruker « ledbpgp2s » est utilisée avec les paramètres suivants

- TD2 = 8K points ; AQ = 0,82 s ; D1 = 1 s et NS = 48 scans
- Délai de diffusion D20 = entre 50 et 150 ms et impulsion gradient P30 = entre 1 et 1,2 ms selon les systèmes observés, avec une rampe linéaire de gradients (de forme = SMSQ) allant de 0,96 à 45,76 $\text{G}\cdot\text{cm}^{-1}$ en 40 points

- SI = 16K points, avec l'application d'une multiplication exponentielle (LB = 0,5 Hz) dans la dimension directe avant la transformée de Fourier

Après correction de la phase et de la ligne de base dans la dimension directe, les données sont analysées avec le logiciel DynamicsCenter implémenté dans Topspin.

2.1.2 Mesure de relaxation T_1

La séquence Bruker « t1ir » est utilisée avec les paramètres suivants, qui varient selon le paramagnétisme du système observé

- TD = 16K à 64K pour une fenêtre spectrale SW = 10 ou 60 ppm
- D1 = 1 ou 12 s et NS = 8 à 16 scans
- 10 expériences sont enregistrées avec un délai τ variant entre 10 s et 2 ms, ou entre 100 ms et 100 μ s

Après correction de la phase et de la ligne de base dans la dimension directe, les données sont analysées avec le logiciel DynamicsCenter implémenté dans Topspin.

2.2 CHAPITRE III : INTERACTION AVEC UNE PROTÉINE MODÈLE

2.2.1 Mesure de diffusion

La séquence Bruker « ledbpqppr2s » avec présaturation est utilisée avec les paramètres suivants

- TD2 = 8K points ; AQ = 0,51 s ; D1 = 1 s et NS = 128 ou 256 scans
- Délai de diffusion D20 = 50 ou 100 ms et impulsion gradient P30 = 2 ms, avec une rampe linéaire de gradients (de forme = SMSQ) allant de 0,96 à 47,18 G.cm⁻¹ en 30 points
- SI = 16K points, avec l'application d'une multiplication exponentielle (LB = 0,3 Hz) dans la dimension directe avant la transformée de Fourier

Après correction de la phase et de la ligne de base dans la dimension directe, les données sont analysées avec le logiciel DynamicsCenter implémenté dans Topspin.

2.2.2 TOCSY

La séquence Bruker « dipsi2phpr » avec présaturation est utilisée avec les paramètres suivants

- TD = 1K points en F2 et 256 points en F1; AQ = 0,10 s ; D1 = 0,5 s et NS = 128 ou 256 scans
- Temps de mélange D9 = 80 ms
- SI = 2K points en F2 et 1K points en F1 (avec prédiction linéaire de 256 points), avec multiplication par une fonction cosinus carré avant la transformée de Fourier

2.2.3 HSQC ¹⁵N

La séquence Bruker « hsqcetgpsi2 » est utilisée avec les paramètres suivants

- TD = 4K points en F2 et 256 points en F1; AQ = 0,26 s ; D1 = 2 s et NS = 16 scans
- SI = 8K points en F2 et 1K points en F1 (avec prédiction linéaire de 256 points), avec multiplication par une fonction cosinus carré avant la transformée de Fourier.

2.3 CHAPITRE IV : INTERACTION AVEC UN DÉCAPEPTIDE

2.3.1 TOCSY

La séquence Bruker « mlevphdcwt » avec suppression de solvant de type « wet » est utilisée avec les paramètres suivants

- TD = 1K points en F2 et 256 points en F1; AQ = 0,13 s ; D1 = 0,8 s et NS = entre 8 et 32 scans
- Temps de mélange D9 = 70 ms
- SI = 2K points en F2 et 1K points en F1 (avec prédiction linéaire de 128 points), avec multiplication par une fonction sinus carré (SSB = 3) avant la transformée de Fourier. La ligne de base du FID est corrigée avec une fonction gaussienne afin de supprimer un peu plus le signal résiduel de l'eau.

2.3.2 ROESY

La séquence Bruker « roesyegpph » avec suppression de solvant de type « excitation sculpting » est utilisée avec les paramètres suivants

- TD = 2K points en F2 et 256 points en F1; AQ = 0,13 s ; D1 = 0,8 s et NS = 32 scans
- spin lock P15 = 200 ms
- SI = 4K points en F2 et 1K points en F1 (avec prédiction linéaire de 256 points), avec multiplication par une fonction cosinus carré avant la transformée de Fourier.

2.3.3 HSQC ^{13}C

La séquence Bruker « hsqcedetgppsp.3 » est utilisée avec les paramètres suivants

- TD = 1K points en F2 et 256 points en F1; AQ = 0,11 s ; D1 = 1 s et NS = 32 ou 54 scans
- SI = 2K points en F2 et 1K points en F1 (avec prédiction linéaire de 128 points), avec multiplication par une fonction cosinus carré avant la transformée de Fourier. La ligne de base du FID est corrigée avec une fonction gaussienne afin de supprimer le bruit à la fréquence de l'eau.

2.3.4 Mesure de diffusion

La séquence Bruker « ledbpqppr2s » avec présaturation est utilisée avec les paramètres suivants

- TD2 = 8K points ; AQ = 0,51 s ; D1 = 2 s et NS = 128 ou 256 scans
- Délai de diffusion D20 = 40 ms et impulsion gradient P30 = 2 ms, avec une rampe linéaire de gradients (de forme = SMSQ10.100) allant de 0,96 à 47,18 G.cm⁻¹ en 16 points
- SI = 16K points, avec l'application d'une multiplication exponentielle (LB = 0,5 ou 1 Hz) dans la dimension directe avant la transformée de Fourier

Après correction de la phase et de la ligne de base dans la dimension directe, les données sont analysées avec le logiciel DynamicsCenter implémenté dans Topspin.

2.4 CHAPITRE VI : APPLICATION À UN SYSTÈME PARAMAGNÉTIQUE

2.4.1 Mesure de diffusion

La séquence Bruker « ledbpqppr2s » est utilisée avec les paramètres suivants

- TD2 = 8K points ; AQ = 0,64 s ; D1 = 1,5 s et NS = 32 scans
- Délai de diffusion D20 = 50 ms et impulsion gradient P30 = 1,4 ms, avec une rampe linéaire de gradients (de forme = SMSQ) allant de 0,96 à 47,18 G.cm⁻¹ en 30 points
- SI = 16K points, avec l'application d'une multiplication exponentielle (LB = 0,5 ou 1 Hz) dans la dimension directe avant la transformée de Fourier

Après correction de la phase et de la ligne de base dans la dimension directe, les données sont analysées avec le logiciel DynamicsCenter implémenté dans Topspin.

2.4.2 Mesure de relaxation T_1

La séquence Bruker « t1ir » est utilisée avec les paramètres suivants, qui varient selon le paramagnétisme du système observé

- TD = 16K ou 128K points pour une fenêtre spectrale SW = 14 ou 200 ppm
- D1 = 10s ou 0,2 s et NS = 16 ou 128 scans
- 10 expériences sont enregistrées avec un délai τ variant entre 10 s et 1 ms, ou entre 1 s et 1 ms

Après correction de la phase et de la ligne de base dans la dimension directe, les données sont analysées avec le logiciel DynamicsCenter implémenté dans Topspin.

2.4.3 COSY

La séquence Bruker « cosygpqf » est utilisée avec les paramètres suivants

- TD = 2K points en F2 et 400 points en F1; AQ = 0,16 s ; D1 = 1 s et NS = 2 scans
- SI = 4K points en F2 et 1K points en F1, avec multiplication par une fonction sinus avant la transformée de Fourier.

2.4.4 HSQC ^{13}C

La séquence Bruker « hsqcedtgpsp.3 » est utilisée avec les paramètres suivants

- TD = 2K points en F2 et 400 points en F1; AQ = 0,16 s ; D1 = 1 s et NS = 2 scans
- SI = 4K points en F2 et 1K points en F1 (avec prédiction linéaire de 400 points), avec multiplication par une fonction cosinus carré avant la transformée de Fourier.

IX - RÉFÉRENCES

1. Tanford, C., *The hydrophobic effect: formation of micelles and biological membranes 2d ed.* J. Wiley.: 1980.
2. Dickerson, R.; Drew, H.; Conner, B.; Wing, R.; Fratini, A.; Kopka, M., The anatomy of A-, B-, and Z-DNA. *Science* **1982**, *216* (4545), 475-485.
3. Fersht, A. R., Catalysis, binding and enzyme-substrate complementarity. *Proc. R. Soc. London, B* **1974**, *187*(1089), 397-407.
4. Snyder, S. H.; Bennett Jr, J. P., Neurotransmitter receptors in the brain: biochemical identification. *Annu. Rev. Physiol.* **1976**, *38* (1), 153-175.
5. Stetefeld, J.; McKenna, S. A.; Patel, T. R., Dynamic light scattering: a practical guide and applications in biomedical sciences. *Biophys. Rev.* **2016**, *8* (4), 409-427.
6. Liang, Y., Applications of isothermal titration calorimetry in protein science. *Acta Biochim. Biophys. Sin.* **2008**, *40* (7), 565-576.
7. Kelly, J. M.; Tossi, A. B.; McConnell, D. J.; OhUigin, C., A study of the interactions of some polypyridylruthenium (II) complexes with DNA using fluorescence spectroscopy, topoisomerisation and thermal denaturation. *Nucleic Acids Res.* **1985**, *13* (17), 6017-6034.
8. Woody, R. W., [4] Circular dichroism. *Methods Enzymol.* **1995**, *246*, 34-71.
9. Meyer, B.; Peters, T., NMR Spectroscopy techniques for screening and identifying ligand binding to protein receptors. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42* (8), 864-890.
10. Cohen, Y.; Avram, L.; Frish, L., Diffusion NMR spectroscopy in supramolecular and combinatorial chemistry: an old parameter--new insights. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2005**, *44* (4), 520-54.
11. Luchinat, E.; Banci, L., A unique tool for cellular structural biology: in-cell NMR. *J. Biol. Chem.* **2016**, *291* (8), 3776-3784.
12. Smith, M. B., *March's Advanced Organic Chemistry: Reactions, Mechanisms, and Structure.* 4th Edition ed.; John Wiley & Sons, Inc.: 1992.
13. Aleksis, R.; Oleskovs, F.; Jaudzems, K.; Pahnke, J.; Biverstål, H., Structural studies of amyloid- β peptides: Unlocking the mechanism of aggregation and the associated toxicity. *Biochimie* **2017**, *140*, 176-192.
14. Zhao, L. N.; Lu, L.; Chew, L. Y.; Mu, Y., Alzheimer's disease—A panorama glimpse. *Int. J. Mol. Sci.* **2014**, *15* (7).
15. Karamanos, T. K.; Kalverda, A. P.; Thompson, G. S.; Radford, S. E., Mechanisms of amyloid formation revealed by solution NMR. *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* **2015**, *88-89*, 86-104.

16. Jensen, K. S.; Linse, S.; Nilsson, M.; Akke, M.; Malmendal, A., Revealing well-defined soluble states during amyloid fibril formation by multilinear analysis of NMR diffusion data. *J. Am. Chem. Soc.* **2019**, *141* (47), 18649-18652.
17. Bellomo, G.; Bologna, S.; Gonnelli, L.; Ravera, E.; Fragai, M.; Lelli, M.; Luchinat, C., Aggregation kinetics of the A β 1–40 peptide monitored by NMR. *Chem. Commun.* **2018**, *54* (55), 7601-7604.
18. Kitchen, D. B.; Decornez, H.; Furr, J. R.; Bajorath, J., Docking and scoring in virtual screening for drug discovery: Methods and applications. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2004**, *3* (11), 935-949.
19. Pellecchia, M.; Sem, D. S.; Wuthrich, K., NMR in drug discovery. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2002**, *1* (3), 211-219.
20. Babine, R. E.; Bender, S. L., Molecular recognition of protein–ligand complexes: applications to drug design. *Chem. Rev.* **1997**, *97* (5), 1359-1472.
21. Shuker, S. B.; Hajduk, P. J.; Meadows, R. P.; Fesik, S. W., Discovering high-affinity ligands for proteins: SAR by NMR. *Science* **1996**, *274* (5292), 1531-1534.
22. McPherson, A., Introduction to protein crystallization. *Methods* **2004**, *34* (3), 254-265.
23. Chiti, F.; Dobson, C. M., Protein misfolding, functional amyloid, and human disease. *Annu. Rev. Biochem.* **2006**, *75* (1), 333-366.
24. Chayen, N. E., Tackling the bottleneck of protein crystallization in the post-genomic era. *Trends Biotechnol.* **2002**, *20* (3), 98.
25. Alex, J. M.; Rennie, M. L.; Volpi, S.; Sansone, F.; Casnati, A.; Crowley, P. B., Phosphonated calixarene as a “molecular glue” for protein crystallization. *Cryst. Growth Des.* **2018**, *18* (4), 2467-2473.
26. Bijelic, A.; Rompel, A., The use of polyoxometalates in protein crystallography – An attempt to widen a well-known bottleneck. *Coord. Chem. Rev.* **2015**, *299*, 22-38.
27. Pompidor, G.; D'Aleo, A.; Vicat, J.; Toupet, L.; Giraud, N.; Kahn, R.; Maury, O., Protein crystallography through supramolecular interactions between a lanthanide complex and arginine. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2008**, *47* (18), 3388-91.
28. Pompidor, G.; Maury, O.; Vicat, J.; Kahn, R., A dipicolinate lanthanide complex for solving protein structures using anomalous diffraction. *Acta. Cryst.* **2010**, *66*, 762-769.
29. Dumont, E.; Pompidor, G.; D'Aleo, A.; Vicat, J.; Toupet, L.; Kahn, R.; Girard, E.; Maury, O.; Giraud, N., Exploration of the supramolecular interactions involving tris-dipicolinate lanthanide complexes in protein crystals by a combined biostructural, computational and NMR study. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2013**, *15* (41), 18235-42.
30. Lehn, J.-M., Supramolecular chemistry—scope and perspectives molecules, supermolecules, and molecular devices (Nobel Lecture). *Angew. Chem. Int. Ed.* **1988**, *27* (1), 89-112.
31. Ma, X.; Zhao, Y., Biomedical Applications of supramolecular systems based on host–guest interactions. *Chem. Rev.* **2015**, *115* (15), 7794-7839.

32. Claridge, T. D. W., *High-Resolution NMR Techniques in Organic Chemistry (Third Edition)*. Elsevier: Boston, 2016.
33. Parella, T., Pulse Program Catalogue: I. 1D and 2D NMR Experiments. Bruker Biospin: 2010.
34. Kwan, E. E.; Huang, S. G., Structural elucidation with NMR spectroscopy: practical strategies for organic chemists. *Eur. J. Org. Chem.* **2008**, 2008 (16), 2671-2688.
35. Reynolds, W. F.; Enríquez, R. G., Choosing the best pulse sequences, acquisition parameters, postacquisition processing strategies, and probes for natural product structure elucidation by NMR spectroscopy. *J. Nat. Prod.* **2002**, 65 (2), 221-244.
36. Edison, A. S.; Schroeder, F. C., 9.06 - NMR – Small molecules and analysis of complex mixtures. In *Comprehensive Natural Products II*, Liu, H.-W.; Mander, L., Eds. Elsevier: Oxford, 2010; pp 169-196.
37. Duus, J.; Gottfredsen, C. H.; Bock, K., Carbohydrate structural determination by NMR spectroscopy: modern methods and limitations. *Chem Rev* **2000**, 100 (12), 4589-614.
38. Jeener, J.; Alewaeters, G., "Pulse pair technique in high resolution NMR" a reprint of the historical 1971 lecture notes on two-dimensional spectroscopy. *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* **2016**, 94-95, 75-80.
39. Bax, A.; Freeman, R., Investigation of complex networks of spin-spin coupling by two-dimensional NMR. *J. Magn. Reson.* **1981**, 44 (3), 542-561.
40. Bax, A.; Davis, D. G., MLEV-17-based two-dimensional homonuclear magnetization transfer spectroscopy. *J. Magn. Reson.* **1985**, 65 (2), 355-360.
41. Shaka, A.; Lee, C.; Pines, A., Iterative schemes for bilinear operators; application to spin decoupling. *J. Magn. Reson.* **1988**, 77 (2), 274-293.
42. Bodenhausen, G.; Ruben, D. J., Natural abundance nitrogen-15 NMR by enhanced heteronuclear spectroscopy. *Chem. Phys. Lett.* **1980**, 69 (1), 185-189.
43. Palmer III, A. G.; Cavanagh, J.; Wright, P. E.; Rance, M., Sensitivity improvement in proton-detected two-dimensional heteronuclear correlation NMR spectroscopy. *J. Magn. Reson.* **1991**, 93 (1), 151-170.
44. Bax, A.; Summers, M. F., Proton and carbon-13 assignments from sensitivity-enhanced detection of heteronuclear multiple-bond connectivity by 2D multiple quantum NMR. *J. Am. Chem. Soc.* **1986**, 108 (8), 2093-2094.
45. Furrer, J., A comprehensive discussion of hmbc pulse sequences, part 1: The classical HMBC. *Concepts Magn. Reson., Part A* **2012**, 40A (3), 101-127.
46. Limongelli, V., Ligand binding free energy and kinetics calculation in 2020. *WIREs Comput. Mol. Sci.* **2020**, 10 (4), 1455.
47. Fielding, L., NMR methods for the determination of protein–ligand dissociation constants. *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* **2007**, 51 (4), 219-242.
48. Du, X.; Li, Y.; Xia, Y.-L.; Ai, S.-M.; Liang, J.; Sang, P.; Ji, X.-L.; Liu, S.-Q., Insights into protein–ligand interactions: mechanisms, models, and methods. *Int. J. Mol. Sci.* **2016**, 17 (2), 144.

49. Krushelnitsky, A.; Reichert, D., Solid-state NMR and protein dynamics. *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* **2005**, *47*(1-2), 1-25.
50. Loria, J. P.; Rance, M.; Palmer, A. G., A relaxation-compensated Carr–Purcell–Meiboom–Gill sequence for characterizing chemical exchange by NMR spectroscopy. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121* (10), 2331-2332.
51. Furukawa, A.; Konuma, T.; Yanaka, S.; Sugase, K., Quantitative analysis of protein–ligand interactions by NMR. *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* **2016**, *96*, 47-57.
52. Korzhnev, D. M.; Salvatella, X.; Vendruscolo, M.; Di Nardo, A. A.; Davidson, A. R.; Dobson, C. M.; Kay, L. E., Low-populated folding intermediates of Fyn SH₃ characterized by relaxation dispersion NMR. *Nature* **2004**, *430* (6999), 586-590.
53. Kleckner, I. R.; Foster, M. P., An introduction to NMR-based approaches for measuring protein dynamics. *Biochim. Biophys. Acta* **2011**, *1814* (8), 942-968.
54. Fielding, L.; Rutherford, S.; Fletcher, D., Determination of protein–ligand binding affinity by NMR: observations from serum albumin model systems. *Magn. Reson. Chem.* **2005**, *43*(6), 463-470.
55. Thordarson, P., Determining association constants from titration experiments in supramolecular chemistry. *Chem. Soc. Rev.* **2011**, *40* (3), 1305-1323.
56. Ulatowski, F.; Dąbrowa, K.; Bałakier, T.; Jurczak, J., Recognizing the limited applicability of job plots in studying host–guest interactions in supramolecular chemistry. *J. Org. Chem.* **2016**, *81* (5), 1746-1756.
57. Carlomagno, T., Ligand-target interactions: what can we learn from NMR? *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **2005**, *34* (1), 245-266.
58. Mayer, M.; Meyer, B., Characterization of ligand binding by saturation transfer difference NMR spectroscopy. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, *38* (12), 1784-1788.
59. Mayer, M.; Meyer, B., Group epitope mapping by saturation transfer difference NMR To identify segments of a ligand in direct contact with a protein receptor. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123* (25), 6108-6117.
60. Williamson, M. P., Using chemical shift perturbation to characterise ligand binding. *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* **2013**, *73*, 1-16.
61. Gossert, A. D.; Jahnke, W., NMR in drug discovery: A practical guide to identification and validation of ligands interacting with biological macromolecules. *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* **2016**, *97*, 82-125.
62. Pintacuda, G.; John, M.; Su, X. C.; Otting, G., NMR structure determination of protein-ligand complexes by lanthanide labeling. *Acc. Chem. Res.* **2007**, *40* (3), 206-12.
63. Lucas, L. H.; Larive, C. K., Measuring ligand-protein binding using NMR diffusion experiments. *Concepts Magn. Reson., Part A* **2004**, *20A* (1), 24-41.
64. D'Aleo, A.; Pompidor, G.; Elena, B.; Vicat, J.; Baldeck, P. L.; Toupet, L.; Kahn, R.; Andraud, C.; Maury, O., Two-photon microscopy and spectroscopy of lanthanide bioprobes. *Chemphyschem* **2007**, *8* (14), 2125-32.

65. Kervern, G.; D'Aleo, A.; Toupet, L.; Maury, O.; Emsley, L.; Pintacuda, G., Crystal-structure determination of powdered paramagnetic lanthanide complexes by proton NMR spectroscopy. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2009**, *48* (17), 3082-6.
66. D'Aleo, A.; Dumont, E.; Maury, O.; Giraud, N., A multidimensional approach to the analysis of chemical shift titration experiments in the frame of a multiple reaction scheme. *Magn. Reson. Chem.* **2013**, *51* (10), 641-8.
67. Bertini, I.; Luchinat, C.; Parigi, G., Magnetic susceptibility in paramagnetic NMR. *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* **2002**, *40* (3), 249.
68. Aime, S.; Botta, M.; Fasano, M.; Terreno, E., Lanthanide (III) chelates for NMR biomedical applications. *Chem. Soc. Rev.* **1998**, *27* (1), 19-29.
69. Di Bari, L.; Salvadori, P., Solution structure of chiral lanthanide complexes. *Coord. Chem. Rev.* **2005**, *249* (24), 2854-2879.
70. John, M.; Otting, G., Strategies for measurements of pseudocontact shifts in protein NMR spectroscopy. *Chemphyschem* **2007**, *8* (16), 2309-13.
71. Allegrozzi, M.; Bertini, I.; Janik, M. B. L.; Lee, Y.-M.; Liu, G.; Luchinat, C., Lanthanide-induced pseudocontact shifts for solution structure refinements of macromolecules in shells up to 40 Å from the metal ion. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122* (17), 4154-4161.
72. Nitsche, C.; Otting, G., Pseudocontact shifts in biomolecular NMR using paramagnetic metal tags. *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* **2017**, *98-99*, 20-49.
73. Su, X. C.; Liang, H.; Loscha, K. V.; Otting, G., [Ln(DPA)₃]³⁻ is a convenient paramagnetic shift reagent for protein NMR studies. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131* (30), 10352-3.
74. 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* (9), 4108-4139.
75. Caravan, P.; Ellison, J. J.; McMurry, T. J.; Lauffer, R. B., Gadolinium (III) chelates as MRI contrast agents: structure, dynamics, and applications. *Chem. Rev.* **1999**, *99* (9), 2293-2352.
76. Pintacuda, G.; Otting, G., Identification of protein surfaces by NMR measurements with a paramagnetic Gd (III) chelate. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124* (3), 372-373.
77. Yagi, H.; Loscha, K. V.; Su, X.-C.; Stanton-Cook, M.; Huber, T.; Otting, G., Tunable paramagnetic relaxation enhancements by [Gd(DPA)₃]³⁻ for protein structure analysis. *J. Biomol. NMR* **2010**, *47* (2), 143-153.
78. Stejskal, E. O.; Tanner, J. E., Spin diffusion measurements: spin echoes in the presence of a time-dependent field gradient. *J. Chem. Phys.* **1965**, *42* (1), 288.
79. Stilbs, P., Fourier transform pulsed-gradient spin-echo studies of molecular diffusion. *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* **1987**, *19* (1), 1-45.
80. Price, W. S., Pulsed-field gradient nuclear magnetic resonance as a tool for studying translational diffusion: Part 1. Basic theory. *Concepts Magn. Reson.* **1997**, *9* (5), 299-336.

81. Johnson Jr, C. S., Diffusion ordered nuclear magnetic resonance spectroscopy: principles and applications. *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* **1999**, *34* (3–4), 203-256.
82. Morris, K. F.; Johnson, C. S., Diffusion-ordered two-dimensional nuclear magnetic resonance spectroscopy. *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*(8), 3139-3141.
83. Simova, S.; Berger, S., Diffusion measurements vs. chemical shift titration for determination of association constants on the example of camphor–cyclodextrin complexes. *J. Inclusion Phenom. Macrocyclic Chem.* **2005**, *53*(3-4), 163-170.
84. Li, D.; Kagan, G.; Hopson, R.; Williard, P. G., Formula weight prediction by internal reference diffusion-ordered NMR spectroscopy (DOSY). *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131* (15), 5627-5634.
85. Yao, S.; Howlett, G. J.; Norton, R. S., Peptide self-association in aqueous trifluoroethanol monitored by pulsed field gradient NMR diffusion measurements. *J. Biomol. NMR* **2000**, *16* (2), 109-119.
86. Evans, R.; Deng, Z.; Rogerson, A. K.; McLachlan, A. S.; Richards, J. J.; Nilsson, M.; Morris, G. A., Quantitative interpretation of diffusion-ordered NMR spectra: can we rationalize small molecule diffusion coefficients? *Angew. Chem.* **2013**, *125* (11), 3281-3284.
87. Assemat, O.; Coutouly, M.-A.; Hajjar, R.; Delsuc, M.-A., Validation of molecular mass measurements by means of diffusion-ordered NMR spectroscopy: Application to oligosaccharides. *C. R. Chim.* **2010**, *13* (4), 412-415.
88. Neufeld, R.; Stalke, D., Accurate molecular weight determination of small molecules via DOSY-NMR by using external calibration curves with normalized diffusion coefficients. *Chem. Sci.* **2015**, *6* (6), 3354-3364.
89. Danielsson, J.; Jarvet, J.; Damberg, P.; Gräslund, A., Translational diffusion measured by PFG-NMR on full length and fragments of the Alzheimer A β (1–40) peptide. Determination of hydrodynamic radii of random coil peptides of varying length. *Magn. Reson. Chem.* **2002**, *40* (13), S89-S97.
90. Crutchfield, C. A.; Harris, D. J., Molecular mass estimation by PFG NMR spectroscopy. *Journal of Magnetic Resonance* **2007**, *185* (1), 179-82.
91. Crockett, M. P.; Zhang, H.; Thomas, C. M.; Byers, J. A., Adding diffusion ordered NMR spectroscopy (DOSY) to the arsenal for characterizing paramagnetic complexes. *Chem. Commun.* **2019**, *55* (96), 14426-14429.
92. Zaïm, A.; Favera, N. D.; Guénée, L.; Nozary, H.; Hoang, T. N. Y.; Eliseeva, S. V.; Petoud, S.; Piguet, C., Lanthanide hexafluoroacetylacetonates vs. nitrates for the controlled loading of luminescent polynuclear single-stranded oligomers. *Chem. Sci.* **2013**, *4* (3), 1125.
93. Dauth, A.; Love, J. A., Synthesis and reactivity of 2-azametallacyclobutanes. *Dalton Trans.* **2012**, *41* (26), 7782-91.
94. Poh, A. W. J.; Aguilar, J. A.; Kenwright, A. M.; Mason, K.; Parker, D., Aggregation of rare earth coordination complexes in solution studied by paramagnetic and DOSY NMR. *Chem. Eur. J.* **2018**, *24* (60), 16170-16175.

95. Salaam, J.; Tabti, L.; Bahamyirou, S.; Lecointre, A.; Hernandez Alba, O.; Jeannin, O.; Camerel, F.; Cianféroni, S.; Bentouhami, E.; Nonat, A. M.; Charbonnière, L. J., Formation of mono- and polynuclear luminescent lanthanide complexes based on the coordination of preorganized phosphonated pyridines. *Inorg. Chem.* **2018**, *57*(10), 6095-6106.
96. Maggini, L.; Toma, F. M.; Feruglio, L.; Malicka, J. M.; Da Ros, T.; Armaroli, N.; Prato, M.; Bonifazi, D., Luminescent blooming of dendronic carbon nanotubes through ion-pairing interactions with an Eu (III) complex. *Chemistry* **2012**, *18*(19), 5889-97.
97. Hamacek, J.; Besnard, C.; Penhouet, T.; Morgantini, P.-Y., Thermodynamics, structure and properties of polynuclear lanthanide complexes with a tripodal ligand: insight into their self-assembly. *Chem. Eur. J.* **2011**, *17*(24), 6753-6764.
98. Dalla Favera, N.; Guenee, L.; Bernardinelli, G.; Piguet, C., In search for tuneable intramolecular intermetallic interactions in polynuclear lanthanide complexes. *Dalton Trans.* **2009**, (37), 7625-38.
99. Beament, J.; Kociok-Köhn, G.; Jones, M. D.; Buchard, A., Bipyrrrolidine salan alkoxide complexes of lanthanides: synthesis, characterisation, activity in the polymerisation of lactide and mechanistic investigation by DOSY NMR. *Dalton Trans.* **2018**, *47*(27), 9164-9172.
100. Natrajan, L. S.; Timmins, P. L.; Lunn, M.; Heath, S. L., Luminescent dinuclear lanthanide complexes of 5-Me-HXTA. *Inorg. Chem.* **2007**, *46*(25), 10877-10886.
101. Rieping, W.; Habeck, M.; Bardiaux, B.; Bernard, A.; Malliavin, T. E.; Nilges, M., ARIA2: Automated NOE assignment and data integration in NMR structure calculation. *Bioinformatics* **2006**, *23*(3), 381-382.
102. Chowdhury, S.; Lee, M. C.; Xiong, G.; Duan, Y., Ab initio folding simulation of the Trp-cage mini-protein approaches NMR resolution. *J. Mol. Biol.* **2003**, *327*(3), 711-717.
103. Case, D. A.; Cheatham III, T. E.; Darden, T.; Gohlke, H.; Luo, R.; Merz Jr., K. M.; Onufriev, A.; Simmerling, C.; Wang, B.; Woods, R. J., The Amber biomolecular simulation programs. *J. Comput. Chem.* **2005**, *26*(16), 1668-1688.
104. Wu, D.; Chen, A.; Johndon, C. S., An improved diffusion-ordered spectroscopy experiment incorporating bipolar-gradient pulses. *J. Magn. Reson., Ser A* **1995**, *115*(2), 260-264.
105. Augé, S.; Amblard-Blondel, B.; Delsuc, M.-A., Investigation of the diffusion measurement using PFG and test of robustness against experimental conditions and parameters. *J. Chim. Phys. Phys.-Chim. Biol.* **1999**, *96*(9/10), 1559-1565.
106. Antalek, B., Using pulsed gradient spin echo NMR for chemical mixture analysis: How to obtain optimum results. *Concepts Magn. Reson.* **2002**, *14*(4), 225-258.
107. Price, W. S., Pulsed-field gradient nuclear magnetic resonance as a tool for studying translational diffusion: Part II. Experimental aspects. *Concepts Magn. Reson.* **1998**, *10*(4), 197-237.
108. Holz, M.; Weingartner, H., Calibration in accurate spin-echo self-diffusion measurements using ¹H and less-common nuclei. *J. Magn. Reson.* **1991**, *92*, 115-125.
109. Delsuc, M.-A.; Malliavin, T. E., Maximum entropy processing of DOSY NMR Spectra. *Anal. Chem.* **1998**, *70*(10), 2146-2148.

110. Cabrita, E. J.; Berger, S., DOSY studies of hydrogen bond association: tetramethylsilane as a reference compound for diffusion studies. *Magn. Reson. Chem.* **2001**, *39* (S1), S142-S148.
111. Jones, J.; Wilkins, D.; Smith, L.; Dobson, C., Characterisation of protein unfolding by NMR diffusion measurements. *J. Biomol. NMR* **1997**, *10* (2), 199-203.
112. Wilkins, D.; Grimshaw, S.; Receveur, V.; Dobson, C.; Jones, J.; Smith, L., Hydrodynamic radii of native and denatured proteins measured by pulse field gradient NMR techniques. *Biochemistry* **1999**, *38* (50), 16424-16431.
113. Holz, M.; Heil, S. R.; Sacco, A., Temperature-dependent self-diffusion coefficients of water and six selected molecular liquids for calibration in accurate ^1H NMR PFG measurements. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2000**, *2* (20), 4740-4742.
114. Furó, I.; Jóhannesson, H., Accurate Anisotropic Water-Diffusion Measurements in Liquid Crystals. *J. Magn. Reson., Ser A* **1996**, *119* (1), 15-21.
115. Guest, J.; Kiraly, P.; Nilsson, M.; Morris, G., Signal-to-noise ratio in diffusion-ordered spectroscopy: how good is good enough? *Magn. Reson. Discuss.* **2021**, *2021*, 1-10.
116. Geil, B., Measurement of translational molecular diffusion using ultrahigh magnetic field gradient NMR. *Concepts Magn. Reson.* **1998**, *10* (5), 299-321.
117. Denis-Quanquin, S.; Riobe, F.; Delsuc, M. A.; Maury, O.; Giraud, N., Paramagnetic DOSY: an accurate tool for the analysis of the supramolecular interactions between lanthanide complexes and proteins. *Chemistry* **2016**, *22* (50), 18123-18131.
118. Li, X.-Z.; Zhou, L.-P.; Yan, L.-L.; Dong, Y.-M.; Bai, Z.-L.; Sun, X.-Q.; Diwu, J.; Wang, S.; Bünzli, J.-C.; Sun, Q.-F., A supramolecular lanthanide separation approach based on multivalent cooperative enhancement of metal ion selectivity. *Nat. Commun.* **2018**, *9* (1), 547.
119. Gruszczyk, J.; Fleurie, A.; Olivares-Illana, V.; Bechet, E.; Zanella-Cleon, I.; Morera, S.; Meyer, P.; Pompidor, G.; Kahn, R.; Grangeasse, C.; Nessler, S., Structure analysis of the staphylococcus aureus UDP-N-acetyl-mannosamine dehydrogenase Cap50 involved in capsular polysaccharide biosynthesis. *J. Biol. Chem.* **2011**, *286* (19), 17112-17121.
120. Wei, Z.; Yang, Y.; Li, Q.-F.; Huang, F.; Zuo, H.-H.; Su, X.-C., Noncovalent tagging proteins with paramagnetic lanthanide complexes for protein study. *Chem. Eur. J.* **2013**, *19*, 5758-5764.
121. Denis-Quanquin, S.; Bartocci, A.; Szczepaniak, F.; Riobé, F.; Maury, O.; Dumont, E.; Giraud, N., Capturing the dynamic association between a tris-dipicolinate lanthanide complex and a decapeptide: a combined paramagnetic NMR and molecular dynamics exploration. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2021**, *23* (19), 11224-11232.
122. Kahlfuss, C.; Denis-Quanquin, S.; Calin, N.; Dumont, E.; Garavelli, M.; Royal, G.; Cobo, S.; Saint-Aman, E.; Bucher, C., Electron-triggered metamorphism in porphyrin-based self-assembled coordination polymers. *J. Am. Chem. Soc.* **2016**, *138* (46), 15234-15242.
123. Kahlfuss, C.; Gibaud, T.; Denis-Quanquin, S.; Chowdhury, S.; Royal, G.; Chevallier, F.; Saint-Aman, E.; Bucher, C., Redox-induced molecular metamorphism promoting a sol/gel phase transition in a viologen-based coordination polymer. *Chem. Eur. J.* **2018**, *24* (49), 13009-13019.

124. Pascal, S.; Denis-Quanquin, S.; Appaix, F.; Duperray, A.; Grichine, A.; Le Guennic, B.; Jacquemin, D.; Cuny, J.; Chi, S. H.; Perry, J. W.; van der Sanden, B.; Monnereau, C.; Andraud, C.; Maury, O., Keto-polymethines: a versatile class of dyes with outstanding spectroscopic properties for in cellulose and in vivo two-photon microscopy imaging. *Chem. Sci.* **2017**, *8*(1), 381-394.
125. Srour, H.; Leocmach, M.; Maffei, V.; Ghogia, A. C.; Denis-Quanquin, S.; Taberlet, N.; Manneville, S.; Andraud, C.; Bucher, C.; Monnereau, C., Poly(ionic liquid)s with controlled architectures and their use in the making of ionogels with high conductivity and tunable rheological properties. *Polym. Chem.* **2016**, *7*(43), 6608-6616.
126. Mattei, C. A.; Montigaud, V.; Gendron, F.; Denis-Quanquin, S.; Dorcet, V.; Giraud, N.; Riobé, F.; Argouarch, G.; Maury, O.; Le Guennic, B.; Cador, O.; Lalli, C.; Pointillart, F., Solid-state versus solution investigation of a luminescent chiral BINOL-derived bisphosphate single-molecule magnet. *Inorg. Chem. Front.* **2021**, *8*(4), 947-962.
127. Harada, T.; Nakano, Y.; Fujiki, M.; Naito, M.; Kawai, T.; Hasegawa, Y., Circularly polarized luminescence of Eu (III) complexes with point- and axis-chiral ligands dependent on coordination structures. *Inorg. Chem.* **2009**, *48*(23), 11242-11250.
128. Ishikawa, N.; Sugita, M.; Ishikawa, T.; Koshihara, S.-y.; Kaizu, Y., Lanthanide double-decker complexes functioning as magnets at the single-molecular level. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*(29), 8694-8695.
129. Woodruff, D. N.; Winpenny, R. E. P.; Layfield, R. A., Lanthanide single-molecule magnets. *Chem. Rev.* **2013**, *113*(7), 5110-5148.
130. Koiso, N.; Kitagawa, Y.; Nakanishi, T.; Fushimi, K.; Hasegawa, Y., Eu (III) chiral coordination polymer with a structural transformation system. *Inorg. Chem.* **2017**, *56*(10), 5741-5747.
131. Augé, S.; Schmit, P.-O.; Crutchfield, C. A.; Islam, M. T.; Harris, D. J.; Durand, E.; Clemancey, M.; Quoineaud, A.-A.; Lancelin, J.-M.; Prigent, Y.; Taulelle, F.; Delsuc, M.-A., NMR measure of translational diffusion and fractal dimension. Application to molecular mass measurement. *J. Phys. Chem. B* **2009**, *113*(7), 1914-1918.
132. Bachmann, S.; Neufeld, R.; Dzemska, M.; Stalke, D., New external calibration curves (ECCs) for the estimation of molecular weights in various common NMR solvents. *Chem. Eur. J.* **2016**, *22*(25), 8462-8465.
133. Evans, R.; Dal Poggetto, G.; Nilsson, M.; Morris, G. A., Improving the interpretation of small molecule diffusion coefficients. *Anal. Chem.* **2018**, *90*(6), 3987-3994.
134. Di Pietro, S.; Piano, S. L.; Di Bari, L., Pseudocontact shifts in lanthanide complexes with variable crystal field parameters. *Coord. Chem. Rev.* **2011**, *255*(23), 2810-2820.
135. Engilberge, S.; Riobé, F.; Di Pietro, S.; Lassalle, L.; Coquelle, N.; Arnaud, C.-A.; Pitrat, D.; Mulatier, J.-C.; Madern, D.; Breyton, C.; Maury, O.; Girard, E., Crystallophore: a versatile lanthanide complex for protein crystallography combining nucleating effects, phasing properties, and luminescence. *Chem. Sci.* **2017**, *8*(9), 5909-5917.
136. Jia, X.; Yagi, H.; Su, X. C.; Stanton-Cook, M.; Huber, T.; Otting, G., Engineering [Ln(DPA)₃]³⁻ binding sites in proteins: a widely applicable method for tagging proteins with lanthanide ions. *J. Biomol. NMR* **2011**, *50*(4), 411-20.

X - ANNEXES

Ces travaux de thèse ont donné lieu à deux publications en premier auteur, qui correspondent aux chapitres II, III et IV de ce manuscrit. Le chapitre VI illustre l'application de cette méthode à l'occasion d'une collaboration, ce qui a donné lieu au troisième article de cette liste. Les articles 4 à 7 sont issus d'autres collaborations mettant en jeu l'expertise que j'ai acquise en mesure de diffusion par RMN au long de ma thèse.

1. Denis-Quanquin, S.; Riobe, F.; Delsuc, M. A.; Maury, O.; Giraud, N., Paramagnetic DOSY: an accurate tool for the analysis of the supramolecular interactions between lanthanide complexes and proteins. *Chemistry* **2016**, 22 (50), 18123-18131.
2. Denis-Quanquin, S.; Bartocci, A.; Szczepaniak, F.; Riobé, F.; Maury, O.; Dumont, E.; Giraud, N., Capturing the dynamic association between a tris-dipicolinate lanthanide complex and a decapeptide: a combined paramagnetic NMR and molecular dynamics exploration. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2021**, 23 (19), 11224-11232.
3. Mattei, C. A.; Montigaud, V.; Gendron, F.; Denis-Quanquin, S.; Dorcet, V.; Giraud, N.; Riobé, F.; Argouarch, G.; Maury, O.; Le Guennic, B.; Cador, O.; Lalli, C.; Pointillart, F., Solid-state versus solution investigation of a luminescent chiral BINOL-derived bisphosphate single-molecule magnet. *Inorg. Chem. Front.* **2021**, 8 (4), 947-962.
4. Kahlfuss, C.; Gibaud, T.; Denis-Quanquin, S.; Chowdhury, S.; Royal, G.; Chevallier, F.; Saint-Aman, E.; Bucher, C., Redox-induced molecular metamorphism promoting a sol/gel phase transition in a viologen-based coordination polymer. *Chem. Eur. J.* **2018**, 24 (49), 13009-13019.
5. Pascal, S.; Denis-Quanquin, S.; Appaix, F.; Duperray, A.; Grichine, A.; Le Guennic, B.; Jacquemin, D.; Cuny, J.; Chi, S. H.; Perry, J. W.; van der Sanden, B.; Monnereau, C.; Andraud, C.; Maury, O., Keto-polymethines: a versatile class of dyes with outstanding spectroscopic properties for in cellulo and in vivo two-photon microscopy imaging. *Chem. Sci.* **2017**, 8 (1), 381-394.
6. Srour, H.; Leocmach, M.; Maffeis, V.; Ghogia, A. C.; Denis-Quanquin, S.; Taberlet, N.; Manneville, S.; Andraud, C.; Bucher, C.; Monnereau, C., Poly(ionic liquid)s with controlled architectures and their use in the making of ionogels with high conductivity and tunable rheological properties. *Polym. Chem.* **2016**, 7 (43), 6608-6616.
7. Kahlfuss, C.; Denis-Quanquin, S.; Calin, N.; Dumont, E.; Garavelli, M.; Royal, G.; Cobo, S.; Saint-Aman, E.; Bucher, C., Electron-triggered metamorphism in porphyrin-based self-assembled coordination polymers. *J. Am. Chem. Soc.* **2016**, 138 (46), 15234-15242.

NMR Investigations

Paramagnetic DOSY: An Accurate Tool for the Analysis of the Supramolecular Interactions between Lanthanide Complexes and Proteins

Sandrine Denis-Quanquin,^[a] François Riobé,^[a] Marc-André Delsuc,^[b] Olivier Maury,^{*[a]} and Nicolas Giraud^{*[c]}

Abstract: Diffusion ordered NMR is implemented to determine accurately the mobility of paramagnetic tris-dipicolinate lanthanide complexes that are versatile probes of protein structure. It is shown that diffusion coefficient ratios can be measured with an accuracy of 1% using a standard BPPLD pulse sequence, which allows for observing significant, though weak, variations when different species are in-

teracting with the paramagnetic compound. We demonstrate that this approach is complementary to classical chemical shift titration experiments, and that it can be applied successfully to probe the supramolecular dynamic interactions between lanthanide complexes and small molecules on the one hand, or to determine rapidly their affinity for a targeted protein.

Introduction

Beside their photo- or electroluminescence properties that have been extensively studied for decades for bio-imaging^[1] or material science applications,^[2] lanthanide ions present increasing potential in the field of structural biology due to their magnetic properties particularly interesting for NMR studies and their X-rays anomalous scattering ability, exploited to solve the phase problem in bio-macromolecular crystallography.^[3] Both methods for establishing the structure of proteins are complementary and require the incorporation of lanthanide ions or related complexes in the macromolecular architecture. To that end, the first approach consisted in taking advantage of the isomorphism between lanthanide (III) and calcium (II) to replace physiological Ca^{2+} by Ln^{3+} ion in calcium-binding protein to solve its structure by NMR^[4] or crystallography.^[5]

The second approach is based on the covalent grafting of a lanthanide complex to the protein skeleton generally per-

formed either using disulfide bridges associated to cysteine residues or by fusion of a lanthanide binding tag composed of a small sequence peptide to the N or C terminus of the protein. This method is known for inducing a modification of the protein structure, although it led to interesting results using either NMR^[6] or crystallography techniques.^[7]

Finally following pioneering works of Kahn and co-workers in the early 2000s, it is possible to incorporate lanthanide complexes into bio-macromolecules via a network of non-covalent interactions for X-rays crystallography structure determination.^[8] This method is very simple and easy to perform but is less predictable since the study of lanthanide complexes–protein interactions is an almost empty field of research.^[9] In this context, we described the use of tris-dipicolinate lanthanide complexes ($[\text{Ln}(\text{DPA})_3]^{3-}$, $\text{DPA} = 2,6\text{-pyridine dicarboxylate}$; Figure 1) that are able to co-crystallize efficiently with a large number of proteins^[10] and we evidenced a particular affinity of this complex for cationic amino acids according to the sequence arginine > histidine > lysine.^[11] The groups of Otting and Su have also used these complexes to determine the structure of the proteins ArgN and ubiquitin in solution by NMR.^[12] Besides these encouraging results, a general and rapid method is however still sought to screen the protein–complex interaction.

To that end, we report herein the implementation of diffusion-ordered NMR spectroscopy (DOSY) to probe a variety of dynamic systems involving lanthanide complexes. To the best of our knowledge, no systematic investigation has been reported to date to address the potential of these complexes as suitable probes for diffusion NMR. Indeed, among the rare cases reported in this field, most of the time diamagnetic La or Lu systems were studied,^[13] although DOSY on Nd, Sm, and Eu complexes have also been described.^[14] The approach that is

[a] S. Denis-Quanquin, Dr. F. Riobé, Dr. O. Maury
Laboratoire de Chimie
UMR 5182, CNRS, Ecole Normale Supérieure de Lyon
Université de Lyon, 46 allée d'Italie, 69007 Lyon (France)
E-mail: olivier.maury@ens-lyon.fr

[b] Dr. M.-A. Delsuc
Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire (IGBMC)
UMR 7104, 1 rue Laurent Fries, BP 10142
67404 Illkirch cedex (France)

[c] Dr. N. Giraud
Equipe RMN en milieu orienté, ICMO, UMR CNRS 8182, Univ Paris Sud
Université Paris-Saclay, 91405 Orsay cedex (France)
E-mail: nicolas.giraud@u-psud.fr

Supporting information for this article and ORCID(s) from the authors are available on the WWW under <http://dx.doi.org/10.1002/chem.201603460>.

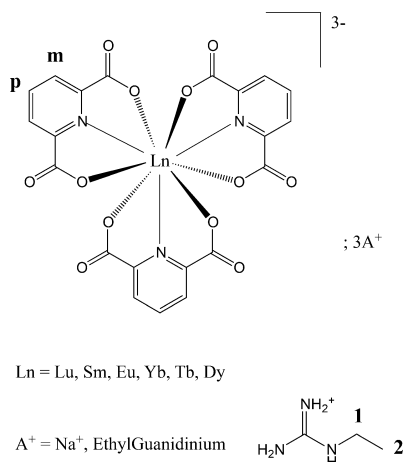


Figure 1. Structure of a tris-dipicolinate lanthanide complex $[A]_3[Ln(DPA)_3]$. The proton from the dipicolinate are labeled m (*meta*) and p (*para*) and those from EthylGuanidinium, 1 and 2.

presented takes benefit of i) the strong pseudo-contact shift effect resulting in a displacement of the 1H NMR signals of paramagnetic lanthanide complexes, leading to a clear separation of these signals and those of the protein, and ii) the large difference of molecular weight between the complex and its adduct with a protein, which is expected to induce a significant variation of the observed diffusion rate upon association.

The well-known series of tris-dipicolinate lanthanide complexes initially reported in the 1970s by Albertsson^[15] is well known for its robustness and its isostructural character both in the solid state and in solution with a propeller-like D_3 symmetric structure. It is therefore a very attractive candidate for numerous physical-chemical studies such as luminescence,^[16] magnetism,^[17] chiroptics,^[18] or nonlinear optics.^[19] This family is composed of both diamagnetic (La, Lu, Y) and paramagnetic complexes featuring identical structures, and it is also particularly well suited for NMR studies. In this context, Piguet and co-workers reported the solution structure and determined the $\Delta\epsilon\Delta$ interconversion barrier in solution by NMR studies^[20] and Pintacuda et al. have set the basis of paramagnetic solid-state NMR using ytterbium microcrystals.^[21] Herein, we also take benefit of the isostructural character of these complexes to address the implementation of a diffusion NMR approach on the whole series. In a first part, the influence of the experimental parameters of a diffusion-ordered NMR experiment on the accuracy of the measurement of self-diffusion coefficients is studied on a diamagnetic system, using $[Na]_3[Lu(DPA)_3]$. Then, the contribution of paramagnetism to the uncertainty of these measurements is investigated using ytterbium analogues featuring only pseudo-contact shift contribution. In a second part, the use of diffusion measurements to study dynamical systems involving supramolecular interactions between lanthanide complexes and small molecular models mimicking the side chains of charged amino acids is described. The influence of

the paramagnetism is then systematically explored by the analysis of a series of lanthanide complexes (Sm, Eu, Pr, Yb, Tm, Tb and Dy). The use of dioxane as an internal reference to compensate for errors induced by critical experimental conditions such as sample temperature is also studied. Finally, we apply this method to the study of the interaction between a tris-dipicolinate lanthanide complex and a model protein, ubiquitin.

Results and Discussion

Diffusion NMR of lanthanide complexes

DOSY NMR has become a method of choice for getting a novel insight into molecular assemblies by exploiting their ability to diffuse at different rates throughout the NMR sample, according to intrinsic properties such as their size or their affinity for their environment.^[22] This method has been shown to provide precious hints about their structure, as well as their interaction with the medium in which they are diffusing. On the one hand, this technique has been introduced as an elegant way to separate the different species from complex mixtures upon a novel dimension being the value of the self-diffusion coefficient of each component.^[23] On the other hand, diffusion NMR has paved the way for the successful analysis of supramolecular interactions between molecules.^[24] The accuracy of the determination of diffusion coefficients by NMR has however been shown to be very sensitive both to the experimental conditions, and to the choice of the algorithm that is used to perform the inverse Laplace transform of the resulting diffusion data.^[25] In particular, it was highlighted in several studies that samples showing distributions of diffusion coefficients, or even dynamic exchanges between species, may lead to deviations in the measurement of effective diffusion coefficients.^[26] For this reason, the quality of the data should be ascertained for any new system and an appropriate analysis method must be chosen accordingly.^[25b]

In this section, the experimental uncertainty that can be reached when diffusion coefficients are measured by NMR on lanthanide complexes is discussed. The robustness of a state-of-the-art pulsed field gradient spin echo (PFGSE) experiment that is routinely implemented to perform the measurement of self-diffusion coefficients is evaluated through a reproducibility study. The influence of the most relevant experimental parameters is addressed, and the contribution of paramagnetism generated by lanthanide ions is investigated.

Experimental uncertainty in diffusion NMR of a diamagnetic lanthanide complex

A diffusion-ordered experiment incorporating bipolar-gradient pulses^[27] was first recorded on a diamagnetic lutetium tris-dipicolinate complex $[Na]_3[Lu(DPA)_3]$ chosen as a model (Figure 2). As expected, the increase of the pulsed field gradient strength leads to a decay of all proton signal intensities due to the diffusion process. These decays were assumed to be mono-exponential with the square of the gradient strength for aromatic protons from DPA, and for dioxane.

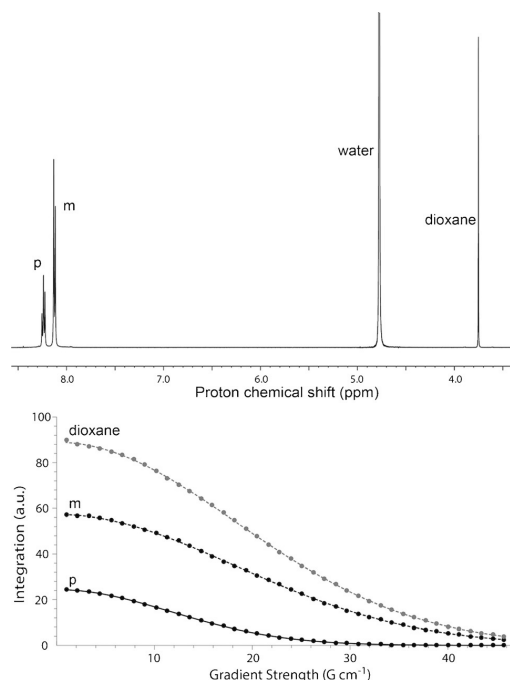


Figure 2. Top: ^1H NMR spectrum of $[\text{Na}]_3[\text{Lu}(\text{DPA})_3]$ (10 mM in D_2O) with 5 mM dioxane added as a reference. The proton spectrum of this complex shows a triplet and a doublet in the aromatic region that are assigned to the para and meta protons from the dipicolinate, respectively. Bottom: typical ^1H decaying curves recorded for dioxane and for the DPA ligands from $\text{Lu}(\text{DPA})_3^{3-}$ by varying the gradient strength in a standard PFGSE experiment incorporating bipolar-gradient pulses.

We remind that the relation between the signal intensity I and the diffusion coefficient D is described by the Stejskal–Tanner equation:^[28]

$$I = I_0 \exp[-\gamma^2 \delta^2 G^2 (\Delta - \delta/3) D] \quad (1)$$

in which I_0 is the intensity without gradient, γ is the gyromagnetic ratio of the observed nucleus, δ is the duration of the gradient pulse, G is the gradient strength and Δ is the diffusion time. Each experimental decaying curve was fitted to equation (1) using a least-square approach. A Monte Carlo simulation was performed to evaluate the standard deviation that is associated to a single analysis for each calculated diffusion coefficient (see the Supporting Information for details about this simulation). The self-diffusion coefficient was thus estimated for the diamagnetic lanthanide complex at $348.11 \pm 0.62 \times 10^{-12} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ ($\pm$ sigma). The standard deviation is much weaker than the one that is generally reported in literature for this kind of measurement, which is coherent with the fact that the uncertainty on the experimental determination of diffusion coefficients by NMR is known to be mainly dominated by the deviations induced by the instability of the NMR spectrometer over time.^[25b,29] Hence, for this kind of sample a single analysis

is not representative of the actual fluctuations that may impact the quality of the resulting decaying curves, and a statistical analysis was thus performed over a higher number of experiments.

The reproducibility of diffusion measurements was then investigated experimentally. A set of 22 experiments was acquired on the same sample under similar conditions, over a period of 5 months. A statistical analysis was performed on the resulting set of diffusion coefficients calculated for both aromatic signals of the lutetium complex. An estimated value $D = 347.7 \pm 2.4 \times 10^{-12} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ was obtained. Figure 3 shows the distribution of the 44 diffusion measurements obtained from each aromatic proton signals, for the 22 experiments. We observe that this distribution follows a normal law, with a 0.7% deviation, which is coherent with the accuracy that has already been reported for similar studies.^[30]

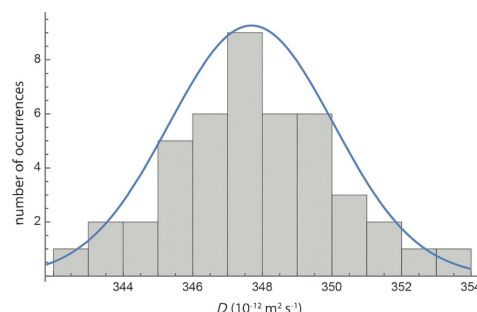


Figure 3. The distribution of the 44 diffusion coefficients measured for $[\text{Na}]_3[\text{Lu}(\text{DPA})_3]$ with optimized acquisition parameters. The normal curve (in blue) that best fits these data is defined by a mean value $347.7 \times 10^{-12} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ and a standard deviation $2.4 \times 10^{-12} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$.

To estimate the robustness of NMR diffusion ordered experiments on this kind of sample, other experiments were run, in which we deliberately misadjusted one acquisition parameter. Five acquisition parameters that are known to play a critical role in diffusion NMR measurements were then explored, for each of whom three experiments were acquired: the number of points of the decaying curve, the recycling delay, the diffusion time (Δ), the number of scans and the spread of the gradient strength G that is sampled (see the Supporting Information). To that end, the strength as well as the linearity of the pulsed field gradient of the spectrometer were carefully calibrated to avoid systematic anomalies that are in general mainly due to eddy currents, gradient non-uniformity and convection due to temperature inhomogeneity.^[25b] Temperature was also carefully regulated at 298 K so as to avoid temperature gradients or vibrations. The lock parameters were checked before each acquisition to guarantee stability throughout the experiment, and avoid phase distortion of intense signals induced by phase errors of the lock signal (data not shown).

The distribution of the resulting 30 diffusion coefficients that were measured for the diamagnetic lanthanide complex with non-optimized parameters is displayed in Figure 4a, against

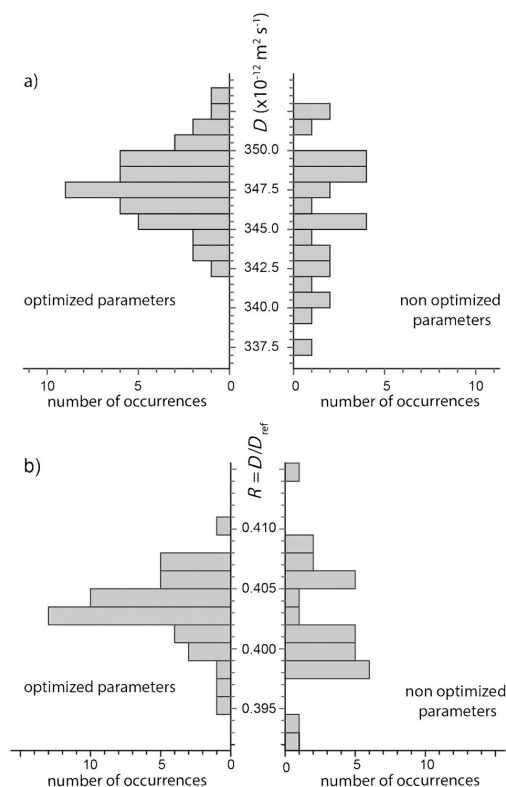


Figure 4. a) The distribution of diffusion coefficients measured for $[\text{Na}_3\text{Lu}(\text{DPA})_3]$, with optimized acquisition parameters (left) and after modification of one acquisition parameter (right). b) The same histograms are shown for the ratio D/D_{ref} with dioxane taken as a reference.

the distribution obtained for optimized experiments. It is clear that the miscalibration of these parameters has yielded a broader distribution. More interestingly, a detailed analysis of these results shows that a decreased number of points of the decaying curve, a short recycling delay or a short diffusion time do not affect significantly the precision and the accuracy of the diffusion coefficient measurement. However, setting a smaller number of scans was observed to lead to a slightly underestimated diffusion coefficient (for the 3 experiments acquired with 8 instead of 48 scans, $D = 341.9 \pm 1.9 \times 10^{-12} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$), whereas a partial sampling of the gradient strength (from 0.48 to 14.45 G cm^{-1}) led to a slightly lower precision ($D = 346.9 \pm 5.5 \times 10^{-12} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$).

To further improve the robustness of these measurements, an internal diffusion reference was used. Such method has been shown to allow for compensating for fluctuations in viscosity or temperature,^[31] and thus opens the way to a proper comparison of diffusion coefficients from different samples. Dioxane was selected as the reference compound, since it does not interact with the different species under study, and shows a single well-resolved proton signal. Its use as an internal refer-

ence has already been reported in the frame of diffusion measurements performed on protein samples.^[32] The ratio $R = D/D_{\text{ref}}$ in which D and D_{ref} are the diffusion coefficients of the lanthanide complex and the reference compound respectively, was calculated for all the diffusion experiments performed with optimized or non-optimized parameters. The resulting distributions are shown in Figure 4b. For the experiments with optimized parameters that follow a normal distribution, a statistical analysis estimated R at 0.403 ± 0.003 , which again corresponds to a deviation of about 0.7%. For the non-optimized experiments, the use of an internal reference has allowed for obtaining a distribution that clearly does not follow a normal law but is qualitatively narrower, which shows that the deviation induced by the miscalibration of each parameter can be at least partially compensated.

Another estimate of the standard deviation on R can be obtained using a method based on the law of propagation of uncertainties. In this approach, the uncertainty $u(R)$ is given by the combined standard uncertainty equation (2):

$$u^2(R) = \left(\frac{\partial R}{\partial D}\right)^2 u^2(D) + \left(\frac{\partial R}{\partial D_{\text{ref}}}\right)^2 u^2(D_{\text{ref}}) + 2 \left(\frac{\partial R}{\partial D}\right) \left(\frac{\partial R}{\partial D_{\text{ref}}}\right) u(D, D_{\text{ref}}) \quad (2)$$

If one assumes that D and D_{ref} are uncorrelated variables, then equation (2) is simplified in equation (3):

$$u(R) = \sqrt{\frac{(\overline{D_{\text{ref}}})^2 (\sigma_D)^2 + (\overline{D})^2 (\sigma_{D_{\text{ref}}})^2}{(\overline{D_{\text{ref}}})^4}} \quad (3)$$

in which $\overline{D}$ and $\overline{D_{\text{ref}}}$ are the mean values for D and D_{ref} , and σ_D and $\sigma_{D_{\text{ref}}}$ their standard deviation. The ratio R of these mean values was estimated under this assumption at 0.403 ± 0.005 , which corresponds to a relative uncertainty $u(R)/R = 1.2\%$. This uncertainty is slightly overestimated compared to the value that is determined from the statistical analysis of the experimental distribution of R ratios, which highlights as expected a negative covariance between D and D_{ref} . The calculated relative uncertainty is in good agreement with the value of 1% that was determined for similar studies such as the accurate measurement of anisotropic diffusion coefficients of water in lyotropic liquid crystals,^[30a] and corroborates the robustness of the diffusion experiment against these acquisition parameters.^[29] This result shows more generally that the main source of deviation in DOSY experiments arises from the spectrometer instability.

Diffusion NMR of paramagnetic lanthanide complexes

Relaxation enhancements that are observed on nuclei located close to paramagnetic centers can be problematic for the determination of accurate diffusion coefficients by NMR.^[13a] The main reason is that fast relaxation induces a line broadening that may be detrimental not only to the resolution, but also to the actual sensitivity of experimental data.^[14a] In order to check

the feasibility of diffusion measurements on paramagnetic trisdipicolinate lanthanide complexes, a reproducibility study was carried on for $[\text{Na}_3[\text{Yb}(\text{DPA})_3]]$. 22 experiments were achieved under the same experimental conditions as those optimized on the diamagnetic $[\text{Na}_3[\text{Lu}(\text{DPA})_3]]$ sample, resulting in 44 diffusion measurements for the aromatic signals. Figure 5 compares the R distributions obtained from these data with those determined from the diamagnetic sample. For $[\text{Na}_3[\text{Yb}(\text{DPA})_3]]$, the mean value $R = 0.402 \pm 0.003$ is similar to the value calculated previously for $[\text{Na}_3[\text{Lu}(\text{DPA})_3]]$ (0.403 ± 0.003). In both cases the standard deviation is found to be smaller than 0.004, which corresponds to a 1 % relative uncertainty.

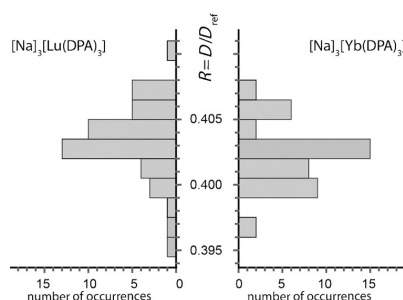


Figure 5. Comparison of the diffusion coefficient ratios R distributions for diamagnetic $[\text{Na}_3[\text{Lu}(\text{DPA})_3]]$ (left) and paramagnetic $[\text{Na}_3[\text{Yb}(\text{DPA})_3]]$ (right) with mean values of 0.403 and 0.402, respectively.

These results show that it is possible to measure diffusion ratios on paramagnetic lanthanide samples with a precision that is comparable to that of a similar diamagnetic lanthanide sample. As long as the NMR spectrometer is carefully calibrated so as to prevent gradient and temperature anomalies, a 1 % relative uncertainty can be determined for the diffusion ratio $R = D/D_{\text{ref}}$ with dioxane taken as the reference diffusing compound. This proves that the precision of the measurements is not affected by the paramagnetism of the lanthanide complex, which suggests that interaction processes inducing small changes in the diffusion coefficient of the involved partners can be monitored. In the following, the diffusion properties of a series of compounds will thus be compared using this method with the assumption of a standard deviation of 1 % for every diffusion ratio determined on any lanthanide complex and their counter ion.

Application to the analysis of dynamic supramolecular systems

In a previous publication, the interaction of a lanthanide complex $[\text{Na}_3[\text{Tb}(\text{DPA})_3]]$ and ethylguanidinium cation (EtGua^+) was studied by a chemical shift titration experiment.^[10a] We showed that this interaction could be modelled by a series of three successive equilibria, with an overall dissociation constant K_d of $5.10 \cdot 10^{-5}$ M. In this section, the suitability of DOSY NMR for observing this interaction process is addressed. Indeed, as pre-

viously reported, it constitutes an interesting tool to evaluate dissociation constants in dynamic systems that is complementary to other techniques.^[33] The diamagnetic adduct $[\text{EtGua}_3][\text{Lu}(\text{DPA})_3]$ was first studied as a model system to determine the general accuracy of the method. Then a series of paramagnetic lanthanide complexes was investigated, in order to determine the lanthanide ion that is the most suitable for chemical or biological applications.

Figure 6 illustrates the variations of the diffusion coefficients that were monitored upon interaction between $[\text{Na}_3[\text{Lu}(\text{DPA})_3]]$ and $[\text{EtGua}][\text{Cl}]$ in aqueous solution. Small changes in diffusion can be observed on classical DOSY spectra generated using standard processing conditions, for both partners involved in the supramolecular interaction (Figure 6a and b).

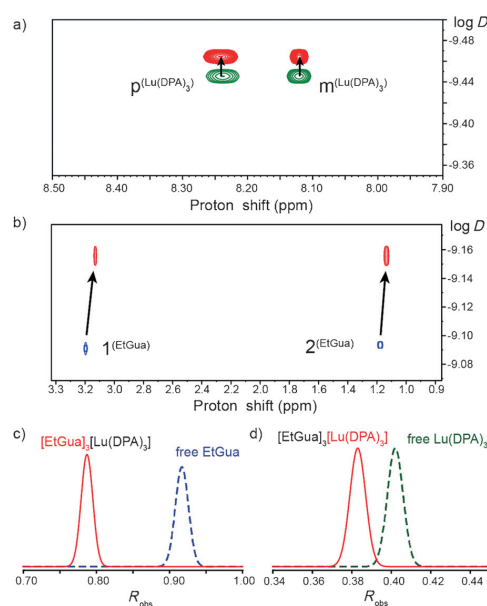


Figure 6. The superposition of the DOSY spectra of the free species $[\text{Na}_3[\text{Lu}(\text{DPA})_3]]$ (green) and $[\text{EtGua}][\text{Cl}]$ (blue), and of the adduct $[\text{EtGua}_3][\text{Lu}(\text{DPA})_3]$ (red). The regions displayed in (a) and (b) correspond to protons p and m from the dipicolinate, and protons 1 and 2 from ethylguanidinium, respectively. The arrows indicate the shift in the diffusion dimension between the free and the interacting species. The Gaussian distributions representing the experimental average ratios D/D_{ref} associated with a 1 % relative uncertainty, for c) the cation EtGua^+ from $[\text{EtGua}_3][\text{Lu}(\text{DPA})_3]$ and $[\text{EtGua}][\text{Cl}]$ and d) the $[\text{Lu}(\text{DPA})_3]^{3-}$ complex from $[\text{EtGua}_3][\text{Lu}(\text{DPA})_3]$ and $[\text{Na}_3[\text{Lu}(\text{DPA})_3]]$. All samples were prepared with the complex and its adduct in concentration 10 mM in D_2O with 5 mM dioxane.

Using the standard deviation reported in the previous section for paramagnetic lanthanide complexes, the diffusion coefficient ratio R_{EtGua} was estimated at 0.917 ± 0.009 for the free $[\text{Cl}][\text{EtGua}]$, whereas it is in the range from 0.787 for ethylguanidinium in interaction with the lutetium complex (Figure 6c). The observed difference is significant and may be used to monitor the interaction process. The ratio R_{LuDPA_3} was also cal-

culated for $[\text{EtGua}]_3[\text{Lu}(\text{DPA})_3]$ at 0.383. A comparison of this value with the ratio of 0.402 ± 0.004 previously determined on the $[\text{Na}]_3[\text{Lu}(\text{DPA})_3]$ sample, which accounts for the free complex, shows a small but still significant difference (Figure 6 d).

As the association is expected to be similar whatever the nature of the lanthanide center, diffusion NMR experiments were then performed on a series of adducts with increasing paramagnetism $[\text{EtGua}]_3[\text{Ln}(\text{DPA})_3]$ ($\text{Ln} = \text{Lu}, \text{Sm}, \text{Eu}, \text{Pr}, \text{Yb}, \text{Tm}, \text{Tb}$ or Dy) (Table 1). The selected lanthanide nuclei cover a wide range of paramagnetic properties that are of interest for the determination of protein structures.^[34] For each metal, the experiment was repeated three times and an average diffusion ratio was calculated for the complex and the cation.

Although no signal could be detected with sufficient sensitivity for the protons from the terbium and dysprosium complexes in the diffusion experiments, due to the fast relaxation properties induced by these paramagnetic centers (corresponding to longitudinal relaxation times shorter than 10 ms),

Table 1. Diffusion ratios and longitudinal relaxation times measured for a series of samples in similar conditions. Proton labels **m**, **p**, **1** and **2** are defined in Figure 1.

	<i>R</i> [a]		<i>T</i> ₁ [ms]			
	$\text{Ln}(\text{DPA})_3$	EtGua	m	p	1	2
$[\text{EtGua}][\text{Cl}]$	–	0.917(9)	–	–	5000	4200
$[\text{EtGua}]_3[\text{Lu}(\text{DPA})_3]$	0.383(4)	0.787(8)	2320	1420	2790	2710
$[\text{EtGua}]_3[\text{Sm}(\text{DPA})_3]$	0.390(4)	0.798(8)	1210	1210	1950	2050
$[\text{EtGua}]_3[\text{Eu}(\text{DPA})_3]$	0.393(4)	0.793(8)	235	560	1160	1360
$[\text{EtGua}]_3[\text{Pr}(\text{DPA})_3]$	0.387(4)	0.783(8)	147	246	823	966
$[\text{EtGua}]_3[\text{Yb}(\text{DPA})_3]$	0.390(4)	0.786(8)	70	151	478	595
$[\text{EtGua}]_3[\text{Tm}(\text{DPA})_3]$	0.387(4)	0.786(8)	11	26	87	113
$[\text{EtGua}]_3[\text{Tb}(\text{DPA})_3]$	–	0.783(8)	2	5	18	24
$[\text{EtGua}]_3[\text{Dy}(\text{DPA})_3]$	–	0.793(8)	1	3	11	15

[a] With dioxane as a reference.

a diffusion ratio could still be determined for ethylguanidium in interaction with these complexes. When it could be accessed, this diffusion ratio was found to be similar for all the lanthanides complexes, which means that it is possible to achieve diffusion-ordered NMR experiments on a wide range of lanthanide complexes—notably Sm , Pr , Yb and Tm —even when large pseudo-contact shifts are induced. The slight variations observed stay within the error range of $\pm 1\%$. It should also be noted that in the case of $[\text{EtGua}]_3[\text{Eu}(\text{DPA})_3]$, proton signals from dioxane and from the proton **m** are overlapping, which led to a slight bias in the diffusion coefficients calculated for both species. These results show that despite their different paramagnetic properties, the same diffusion coefficients can be determined for every lanthanide complexes that may thus all be considered without distinction regarding their diffusion properties.

In the following, ytterbium was selected to carry out a titration experiment and probe the interaction process between $[\text{Yb}(\text{DPA})_3]^{3-}$ and EtGua^+ ions, because on the one hand the four signals of interest are well resolved in the resulting proton spectrum, and on the other hand longitudinal relaxation times determined for this sample are suitable for diffusion NMR measurements. The evolution of the diffusion coefficient ratios and of the proton shifts of both partners were monitored simultaneously upon addition of $[\text{EtGua}][\text{Cl}]$ to a solution of $[\text{Na}]_3[\text{Yb}(\text{DPA})_3]$ (Figure 7). We remind that the observed signals reflect a fast exchange rate, and that each measured diffusion coefficient as well as proton shift is the sum of the contributions of the different species involved in the series of equilibria.^[10a] Diffusion and chemical shift data were fitted simultaneously by curves modelling the series of 3 equilibria, using a standard least-square method (Figure 7; plain curves). The diffusion coefficients of the different adducts were estimated using the model introduced by Morris and coworkers.^[35]

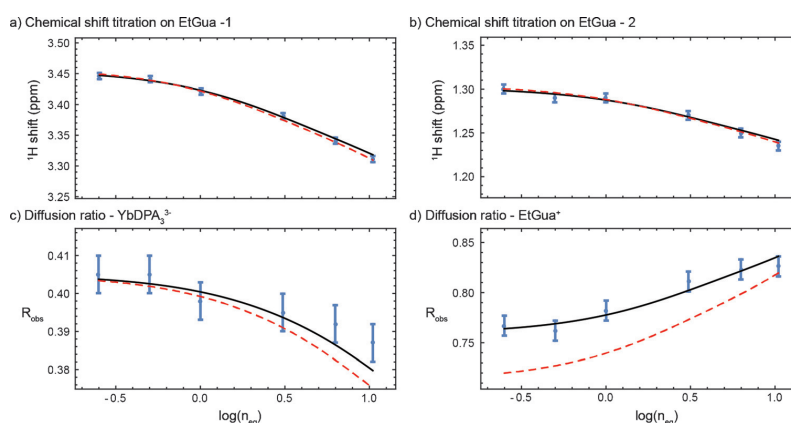


Figure 7. The proton shift titration curves that were obtained from the signals of protons **1** (a) and **2** (b) from EtGua^+ , upon addition of n_{eq} equivalents of $[\text{EtGua}][\text{Cl}]$ to a solution of $[\text{Na}]_3[\text{Yb}(\text{DPA})_3]$ at initial concentration 10 mM in D_2O , with 5 mM dioxane. In (c) and (d) the evolution of the diffusion coefficient ratios determined for the signals of the protons from $[\text{Yb}(\text{DPA})_3]^{3-}$ and EtGua^+ are shown. Red dashed lines correspond to the simulation curves modelling the interaction process, and incorporating thermodynamic constants that were adjusted only on the basis of the chemical shift data. Plain black lines correspond to the same model curve calculated with affinity constants values adjusted by fitting simultaneously diffusion and proton shift data.^[11]

Thermodynamic constants $K_i^{\text{Diff+PCS}}$ with $\log K_1^{\text{Diff+PCS}} = 1.63$, $\log K_2^{\text{Diff+PCS}} = 0.83$ and $\log K_3^{\text{Diff+PCS}} = 0.94$ were determined from this fitting procedure, in good agreement with the values that were obtained in a previous study for the same equilibrium.^[11] It is interesting to note that the K_i^{PCS} 's obtained by fitting only the proton shifts ($\log K_1^{\text{PCS}} = 1.8$, $\log K_2^{\text{PCS}} = 1.0$ and $\log K_3^{\text{PCS}} = 1.1$) do not allow for reproducing accurately the diffusion data when they are used as parameters of the model curves calculated to simulate the evolution of the observed diffusion coefficient ratios (Figure 7; dashed curves. See equations S4 and S5 in the Supporting Information for details about the model curves). The improvement observed in the quality of the fitted curves shows that diffusion ordered NMR may provide complementary and useful measurements to the chemical shifts that are classically exploited in titration experiments to constrain the thermodynamical parameters of such dynamic system. In conclusion for this part, diffusion ordered NMR can be implemented to monitor small variations in the diffusion properties of molecular or supramolecular species that are involved in a dynamic process, even when one of the partners is a paramagnetic complex. Diffusion coefficients can be determined with a high accuracy for molecular or supramolecular systems showing longitudinal relaxation times longer than 10 ms for protons. It should be noted that when $T_1 < 10$ ms, diffusion data of good quality can still be obtained by probing protons that are located further from the paramagnetic lanthanide center. This approach turns out to be a general method for assessing the mobility of compounds involving paramagnetic complexes in a wide range of applications. In the following, the suitability of such approach for probing the non-covalent interaction between a tris-dipicolinate complex and a protein is investigated.

Diffusion NMR of a paramagnetic lanthanide complex binding to a protein

In this section, the suitability of diffusion NMR for determining directly affinity constants is addressed in the frame of a supramolecular interaction between a lanthanide complex and a protein, which can be modelled by a simple 1:1 equilibrium process. Ubiquitin is a well-known protein that has been recently used to demonstrate that non-covalent interaction between a tris-dipicolinate complex and a protein constitutes a way of labeling proteins with a paramagnetic probe to obtain structural restraints.^[12b] Ubiquitin was thus chosen herein to evaluate the potential of diffusion NMR for probing biomolecular interactions involving paramagnetic species. This approach is classified as a ligand observed method: although almost no change is to be observed in the diffusion rate of the protein in interaction with a much smaller molecule, the lanthanide complex is expected to diffuse significantly slower, even in case of a weak interaction.

To avoid any overlay between proton signals coming from the complex and those from the protein, a praseodymium complex was chosen based on the aforementioned measurements. A series of diffusion experiments was thus performed with an increasing $[\text{Pr}(\text{DPA})_3]^{3-}$:ubiquitin ratio (from 0.5 to

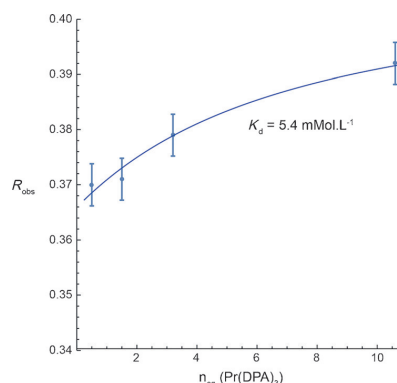


Figure 8. The evolution of the observed diffusion coefficient ratio of $[\text{Pr}(\text{DPA})_3]^{3-}$ upon addition of n_{eq} equivalents of $[\text{Na}_3[\text{Pr}(\text{DPA})_3]]$ to a solution of bovine ubiquitin at initial concentration 1 mM in 10 mM PBS, pH 7.0, with 2 mM dioxane. The blue curve (solid line) corresponds to the best fit obtained by adjusting K_d and the diffusion coefficient ratio of the complex.

10.6). The evolution of the observed diffusion coefficient ratio is reported in Figure 8. A model curve accounting for the equilibrium between interacting and free species was fitted to these data, leading to the determination of a dissociation constant $K_d = 5.4 \text{ mmol L}^{-1}$. This value is coherent with that of the dissociation constant $K_d' = 5.1 \text{ mmol L}^{-1}$ that was obtained through the analysis of the variations of proton shifts in ubiquitin monitored during the same titration experiment.^[36] It should be noted here that since we used a non-labelled ubiquitin sample in our experiments, the variation of the proton shifts was not monitored on ^{15}N HSQC spectra as usual in such studies. However, thanks to the small size of the chosen protein, we were able to extract these variations from TOCSY spectra for several residues (see Figure S10, S11 and Table S4 in Supporting Information for details about the analysis of the TOCSY spectra).

From this result, it is apparent that diffusion NMR is suitable for probing accurately the non-covalent interactions between small complexes incorporating a paramagnetic lanthanide metal and proteins. We remark furthermore that this approach does not necessarily require a ^{15}N -labelled protein to record exploitable data, and that the overall experimental and analytical process required to probe the affinity between a lanthanide complex and a protein is potentially less time consuming when diffusion NMR is implemented. We also note that for higher numbers of equivalents n_{eq} interactions between the protein and several lanthanide complexes may need to be considered as soon as the protein shows several accessible interaction sites. In this latter case, the measurement of a single diffusion coefficient will not be sufficient to constrain all the parameters of the resulting interaction model.

Conclusion

In this work, we have shown that diffusion NMR techniques are suitable for accurately characterizing the mobility of chemi-

cal species involving a paramagnetic lanthanide metal. A careful analysis of the quality of diffusion data has been performed for model samples containing either diamagnetic or paramagnetic lanthanide tris-dipicolinate complexes, which allowed for addressing the influence of the main experimental parameters on the repeatability as well as the reproducibility of the implemented BPLED pulse sequence. Optimized experimental settings were thus implemented into a protocol that was applied successfully to the analysis of dynamic systems involving paramagnetic species. On the one hand, it was shown that diffusion NMR can be a complementary technique to standard chemical shift titration experiments to probe interaction processes between lanthanide complexes and small molecules, involving the formation of several intermediate adducts. On the other hand, we have demonstrated that it is possible to use the paramagnetism of the lanthanide metal to monitor accurately the non-covalent interaction between tris-dipicolinate complexes and proteins, without needing to analyze the variations of the chemical shifts within the protein. This approach is rather flexible since it allows for selecting different lanthanide ions according to their paramagnetism, except for terbium and dysprosium, because they induce too strong paramagnetic relaxation enhancements. Diffusion ordered NMR could thus become a simple and efficient tool for chemists who want to rapidly monitor the affinity of a given lanthanide complex for a protein of interest.

Experimental Section

Synthesis

Reagents were purchased from ACROS organics (dipicolinic acid), Alfa Aesar (ethylguanidine hydrochloride) and Fluka (sodium carbonate). Lanthanide chloride hexahydrates were purchased from these providers with the highest purity available (>99.99%). Ubiquitin from bovine erythrocytes was purchased from Sigma-Aldrich as lyophilized powder (assay >98%). General procedures for the preparation of $[\text{Na}_3\text{Ln}(\text{DPA})_3]$ and $[\text{EtGua}]_3[\text{Ln}(\text{DPA})_3]$ are detailed in the Supporting Information.

NMR experiments

Samples for the NMR experiments were prepared by dissolution of the crystallized lanthanide complexes in deuterated water at a concentration of 10 mM, with addition of 1,4-dioxane at a final concentration of 5 mM as a reference. For the ubiquitin sample, PBS was diluted in D_2O to obtain a 10 mM buffer at pH 7.0. The protein was solubilized in this buffer at a final concentration of 1 mM, with 5 mM dioxane.

All experiments were carried out on a Bruker Avance 500 spectrometer equipped with a pulsed gradient unit capable of producing z -gradient of 48.15 G cm^{-1} . All 1D proton and DOSY spectra were acquired in a 5 mm inverse probe at 298 K, with an air flow of 400 L min^{-1} . T_1 measurements were performed using the inversion recovery sequence. 16 K or 64 K points were acquired for a spectral width of 10 or 60 ppm. The relaxation delay was set to 1 s for the strongly paramagnetic samples and to 12 s for the other samples. 10 experiments were recorded with a delay τ varying between 100 ms and 100 μs for the strongly paramagnetic samples and between 10 s and 2 ms otherwise.

Diffusion NMR

Diffusion experiments were performed using the bipolar pulse longitudinal eddy current delay (BPLED) pulse sequence.^[27] Sine shaped pulse field gradient were used with a length δ in the range 1.0–1.2 ms and the gradient intensity was linearly incremented from 0.96 to 45.76 G cm^{-1} over 40 experiments. After each gradient pulse a 200 μs delay was used as a recovery delay. The diffusion time Δ was chosen between 50 and 150 ms. Data were processed with Topspin 3.5. The phase and baseline of each proton spectrum were carefully corrected and the signal from dioxane was used as a secondary reference (3.75 ppm). Diffusion curves were then fitted using the DynamicsCenter implemented in Topspin.

Acknowledgements

This work was supported by the French Research Agency (ANR-13-BS07-0007-03).

Keywords: diffusion-ordered NMR • lanthanides • paramagnetism • protein • supramolecular chemistry

- [1] A. J. Amoroso, S. J. A. Pope, *Chem. Soc. Rev.* **2015**, *44*, 4723–4742.
- [2] S. V. Eliseeva, J.-C. G. Bunzli, *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *39*, 189–227.
- [3] K. Djinić-Carugo, O. Carugo, *J. Inorg. Biochem.* **2015**, *143*, 69–76.
- [4] a) M. Allegrozzi, I. Bertini, M. B. L. Janik, Y. M. Lee, G. H. Lin, C. Luchinat, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 4154–4161; b) D. Bentrop, I. Bertini, C. Luchinat, W. Nitschke, U. Mühlenhoff, *Biochemistry* **1997**, *36*, 13629–13637.
- [5] J. Reuben, *Naturwissenschaften* **1975**, *62*, 172–178.
- [6] a) L. J. Martin, M. J. Hahnke, M. Nitz, J. Wöhnert, N. R. Silvaggi, K. N. Allen, H. Schwalbe, B. Imperiali, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 7106–7113; b) X. Jia, H. Yagi, X. C. Su, M. Stanton-Cook, T. Huber, G. Otting, *J. Biomol. NMR* **2011**, *50*, 411–420; c) B. Graham, C. T. Loh, J. D. Swarbrick, P. Ung, J. Shin, H. Yagi, X. Y. Jia, S. Chhabra, N. Barlow, G. Pintacuda, T. Huber, G. Otting, *Bioconjugate Chem.* **2011**, *22*, 2118–2125; d) A. Canales, A. Mallagaray, J. Perez-Castells, I. Boos, C. Unverzagt, S. Andre, H. J. Gabius, F. J. Canada, J. Jimenez-Barbero, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 13789–13793; *Angew. Chem.* **2013**, *125*, 14034–14038.
- [7] a) N. R. Silvaggi, L. J. Martin, H. Schwalbe, B. Imperiali, K. N. Allen, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 7114–7120; b) M. D. Purdy, P. H. Ge, J. Y. Chen, P. R. Selvin, M. C. Wiener, *Acta Crystallogr.* **2002**, *58*, 1111–1117.
- [8] E. Girard, M. Stelter, J. Vicat, R. Kahn, *Acta Crystallogr.* **2003**, *59*, 1914–1922.
- [9] C. L. Davies, E. L. Dux, A. K. Duhme-Klair, *Dalton Trans.* **2009**, 10141–10154.
- [10] a) G. Pompidor, A. D'Aleo, J. Vicat, L. Toupet, N. Giraud, R. Kahn, O. Maury, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 3388–3391; *Angew. Chem.* **2008**, *120*, 3436–3439; b) G. Pompidor, O. Maury, J. Vicat, R. Kahn, *Acta Crystallogr.* **2010**, *66*, 762–769; c) J. Gruszczyk, A. Fleurie, V. Olivares-Ilana, E. Bechet, I. Zanella-Cleon, S. Morera, P. Meyer, G. Pompidor, R. Kahn, C. Grangeasse, S. Nessler, *J. Biol. Chem.* **2011**, *286*, 17112–17121; d) R. Talon, R. Kahn, M. A. Dura, O. Maury, F. M. D. Vellieux, B. Franzetti, E. Girard, *J. Synchrotron Radiat.* **2011**, *18*, 74–78; e) A. Flayhan, F. M. D. Vellieux, R. Lurz, O. Maury, C. Contreras-Martel, E. Girard, P. Boulanger, C. Breyton, *J. Virol.* **2014**, *88*, 820–828.
- [11] a) A. D'Aléo, E. Dumont, O. Maury, N. Giraud, *Magn. Reson. Chem.* **2013**, *51*, 641–648; b) E. Dumont, G. Pompidor, A. D'Aleo, J. Vicat, L. Toupet, R. Kahn, E. Girard, O. Maury, N. Giraud, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2013**, *15*, 18235–18242.
- [12] a) X. C. Su, H. Liang, K. V. Loscha, G. Otting, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 10352–10353; b) Z. Wei, Y. Yang, Q.-F. Li, F. Huang, H.-H. Zuo, X.-C. Su, *Chem. Eur. J.* **2013**, *19*, 5758–5764.
- [13] a) A. Dauth, J. A. Love, *Dalton Trans.* **2012**, *41*, 7782–7791; b) A. Zaim, N. D. Favera, L. Guénée, H. Nozary, T. N. Y. Hoang, S. V. Eliseeva, S. Petoud, C. Piguet, *Chem. Sci.* **2013**, *4*, 1125.

- [14] a) L. S. Natrajan, P. L. Timmins, M. Lunn, S. L. Heath, *Inorg. Chem.* **2007**, *46*, 10877–10886; b) N. Dalla Favera, L. Guenee, G. Bernardinelli, C. Piguet, *Dalton Trans.* **2009**, 7625–7638; c) L. Maggini, F. M. Toma, L. Feruglio, J. M. Malicka, T. Da Ros, N. Armadori, M. Prato, D. Bonifazi, *Chemistry* **2012**, *18*, 5889–5897.
- [15] a) J. Albertsson, *Acta Chem. Scand.* **1970**, *24*, 1213–1219; b) J. Albertsson, *Acta Chem. Scand.* **1972**, *26*, 985–1004; c) J. Albertsson, *Acta Chem. Scand.* **1972**, *26*, 1005–1017; d) J. Albertsson, *Acta Chem. Scand.* **1972**, *26*, 1023–1044.
- [16] a) A. Aebischer, F. Gumy, J. C. Bunzli, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2009**, *11*, 1346–1353; b) C. Reinhard, H. U. Gudel, *Inorg. Chem.* **2002**, *41*, 1048–1055.
- [17] M. Sugita, N. Ishikawa, T. Ishikawa, S. Y. Koshihara, Y. Kaizu, *Inorg. Chem.* **2006**, *45*, 1299–1304.
- [18] a) D. H. Metcalf, S. W. Snyder, J. N. Demas, F. S. Richardson, *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 469–479; b) T. A. Hopkins, J. P. Bolender, D. H. Metcalf, F. S. Richardson, *Inorg. Chem.* **1996**, *35*, 5347–5355; c) G. Muller, J. P. Riehl, *J. Fluoresc.* **2005**, *15*, 553–558; d) A. Moussa, C. Pham, S. Bommireddy, G. Muller, *Chirality* **2009**, *21*, 497–506.
- [19] a) N. Tancrez, C. Feuvrie, I. Ledoux, J. Zyss, L. Toupet, H. Le Bozec, O. Maury, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 13474–13475; b) A. D'Aléo, G. Pompidor, B. Elena, J. Vicat, P. L. Baldeck, L. Toupet, R. Kahn, C. Andraud, O. Maury, *Chemphyschem* **2007**, *8*, 2125–2132.
- [20] N. Ouali, B. Bocquet, S. Rigault, P.-Y. Morgantini, J. Weber, C. Piguet, *Inorg. Chem.* **2002**, *41*, 1436–1445.
- [21] G. Kervern, A. D'Aléo, L. Toupet, O. Maury, L. Emsley, G. Pintacuda, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 3082–3086; *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 3128–3132.
- [22] C. A. Crutchfield, D. J. Harris, *J. Magn. Reson.* **2007**, *185*, 179–182.
- [23] C. S. Johnson Jr, *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* **1999**, *34*, 203–256.
- [24] Y. Cohen, L. Avram, L. Frish, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2005**, *44*, 520–554; *Angew. Chem.* **2005**, *117*, 524–560.
- [25] a) L. Van Lokeren, R. Kerssebaum, R. Willem, P. Denkova, *Magn. Reson. Chem.* **2008**, *46 Suppl 1*, S63–71; b) B. Antalek, *Concepts Magn. Reson.* **2002**, *14*, 225–258.
- [26] R. Huo, R. Wehrens, J. v. Duynhoven, L. M. C. Buydens, *Anal. Chim. Acta* **2003**, *490*, 231–251.
- [27] D. Wu, A. Chen, C. S. Johnson, *J. Magn. Reson. Ser. A* **1995**, *115*, 260–264.
- [28] E. O. Stejskal, J. E. Tanner, *J. Chem. Phys.* **1965**, *42*, 288.
- [29] S. Augé, B. Amblard-Blondel, M. A. Delsuc, *J. Chim. Phys.* **1999**, *96*, 1559–1565.
- [30] a) I. Furó, H. Jóhannesson, *J. Magn. Reson. Ser. A* **1996**, *119*, 15–21; b) M. Holz, S. R. Heil, A. Sacco, *PCCP* **2000**, *2*, 4740–4742.
- [31] E. J. Cabrita, S. Berger, *Magn. Reson. Chem.* **2001**, *39*, S142–S148.
- [32] J. Jones, D. Wilkins, L. Smith, C. Dobson, *J. Biomol. NMR* **1997**, *10*, 199–203.
- [33] a) S. Simova, S. Berger, *J. Inclusion Phenom. Macrocyclic Chem.* **2005**, *53*, 163–170; b) L. Fielding, *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* **2007**, *51*, 219–242; c) K. S. Cameron, L. Fielding, *J. Org. Chem.* **2001**, *66*, 6891–6895; d) B. Meyer, T. Peters, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 864–890; *Angew. Chem.* **2003**, *115*, 890–918; e) L. H. Lucas, C. K. Larive, *Concepts Magn. Reson. Part A* **2004**, *20A*, 24–41.
- [34] G. Pintacuda, M. John, X. C. Su, G. Otting, *Acc. Chem. Res.* **2007**, *40*, 206–212.
- [35] R. Evans, Z. Deng, A. K. Rogerson, A. S. McLachlan, J. J. Richards, M. Nilsson, G. A. Morris, *Angew. Chem.* **2013**, *125*, 3281–3284.
- [36] We note that this K_d value is different from that found by Su et al. in a previous paper (*Chem. Eur. J.* **2013**, *19*, 5758–5764). This difference can be explained by the fact that the concentrations, the buffer as well as the pH in the solution are different in each study. We remark however that Su et al. also report weaker affinities at pH values higher than 6.4.

Received: July 21, 2016

Published online on November 2, 2016



Cite this: *Phys. Chem. Chem. Phys.*,
2021, 23, 11224

Capturing the dynamic association between a tris-dipicolinate lanthanide complex and a decapeptide: a combined paramagnetic NMR and molecular dynamics exploration†

Sandrine Denis-Quanquin,^a Alessio Bartocci,^a Florence Szczepaniak,^a
Francois Riobé,^a Olivier Maury,^a Elise Dumont^{*ab} and Nicolas Giraud^{†c}

In the realm of biomolecules, peptides can present a large diversity of structures. Our study sheds new light on the structural interplay between a tris-dipicolinate lanthanide probe and a decapeptide SASYKTLPRG. Although a rather trivial, electrostatically driven interaction was expected, the combination of paramagnetic NMR and molecular dynamics simulations reveals a highly dynamic association process and allows for providing extensive insights into the interaction sites and their occupancy. This study highlights the importance of a large conformational sampling to reconcile characteristic time in NMR with molecular dynamics simulations, where sampling in the microsecond range is needed. This study opens the door for a detailed mechanistic elucidation of the early steps of lanthanide complex-peptide or lanthanide complex-protein interaction or self-assembly processes.

Received 19th December 2020,
Accepted 13th March 2021

DOI: 10.1039/d0cp06570f

rsc.li/pccp

Introduction

Lanthanide ions and complexes have proved to be a versatile tool to study biomolecules (proteins, peptides, as well as lipids and DNA). They may be used as a binding tag,¹ for supramolecular recognition,^{2,3} (chiral-) sensing⁴ and even in immuno assays.^{5,6} Such applications often take advantage of the luminescence and chiroptical properties of lanthanide complexes.^{7,8} Although lanthanide-biomolecule interactions have been widely investigated, only 72 structures of proteins in the presence of lanthanide ions or complexes are currently reported in the Protein Data Bank (PDB). The paradigm may have shifted recently as lanthanide ions have been proposed as agents for protein assisted co-crystallization, on account of their phasing^{9–11} and, more surprisingly, nucleating properties.¹² They may be used as “molecular glues”,^{13,14} namely chemical auxiliaries, used to consolidate protein-protein interfaces.

Thus an increasingly large number of co-crystallized structures with lanthanide complexes have lately entered the PDB.^{15–17} However, the specifics of the interaction of lanthanide complexes with biomolecules in solution are still obscure. The challenge is thus to build up a dynamic view of the non-covalent binding process. One of the best experimental method relying on the electronic properties of lanthanides is paramagnetic nuclear magnetic resonance (NMR), which has emerged as a powerful tool for structural elucidation of proteins.^{18–20} Whereas the complete structural elucidation is possible using pseudo contact shifts (PCS) and paramagnetic relaxation enhancements (PRE), this still remains a significant challenge. In this regard such studies are usually coupled with docking²¹ and/or molecular dynamics.^{22,23}

In this paper, we report an exhaustive structural exploration of the dynamic association between a lanthanide probe and a disordered peptide. We carried out paramagnetic NMR techniques and all-atom molecular dynamics in the microsecond time range to probe the interaction process between the two partners (Fig. 1).

The tris-dipicolinate lanthanide complex [Ln(DPA)₃]^{3–} is one of the first system of its kind whose ability to develop supramolecular interactions with proteins has been reported.^{11,21,24–27} Its properties have paved the way for the development of versatile non-covalent tags which can be used to induce protein crystallization, and/or as anomalous scatterer to solve the phase problem. Furthermore, the structure of [Ln(DPA)₃]^{3–} is simple, and it exists as a racemic mixture of two enantiomers Λ and Δ which undergo a rapid interconversion in water at room temperature.²⁸

^a Univ. Lyon, ENS de Lyon, CNRS UMR 5182, Université Claude Bernard Lyon 1, Laboratoire de Chimie, F69342, Lyon, France. E-mail: elise.dumont@ens-lyon.fr

^b Institut Universitaire de France, 5 rue Descartes, 75005, Paris, France

^c Université de Paris, Laboratoire de Chimie et Biochimie Pharmacologiques et Toxicologiques, UMR CNRS 8601, Paris, France. E-mail: nicolas.giraud@u-paris.fr

† Electronic supplementary information (ESI) available: 2D ¹³C–¹H HSQC and ¹H–¹H ROESY NMR spectra recorded on the peptide P; ¹H shifts assignment in P at each step of the NMR titration experiment using a terbium complex; ¹H NMR titration curves; 2D ¹³C–¹H HSQC spectra recorded upon addition of a gadolinium complex to P; informations on the detail of molecular dynamics calculations. See DOI: 10.1039/d0cp06570f

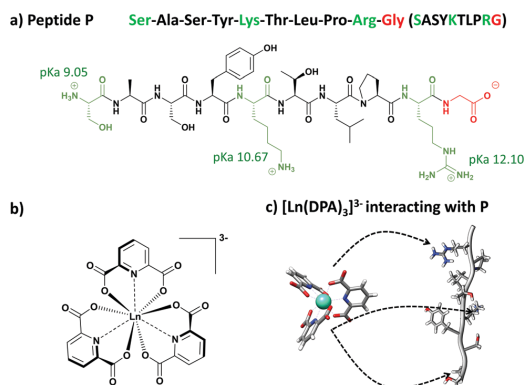


Fig. 1 Structures of (a) a decapeptide SASYKTLP Δ RG denoted **P** hereafter, (b) the tris-dipicolinate lanthanide complex and (c) the adduct $\text{P}:[\text{Ln}(\text{DPA})_3]^{3-}$ (the Δ enantiomer is shown). The three positively-charged residues are denoted in green (serine S1 is uncapped) and correspond to the possible anchoring points with the lanthanide complex. The last residue is a C-terminal, uncapped, hence negatively-charged glycine (in red).

On the other hand, the SASYKTLP Δ RG sequence of the chosen decapeptide **P** makes it a candidate to bind $[\text{Ln}(\text{DPA})_3]^{3-}$ without presenting a unique, somewhat trivial, association mode. This peptide offers several key characteristics: (i) it features two positively-charged side chains and an $-\text{NH}_3^+$ termini, which should promote competitive electrostatic interactions as **P** presents two extremal and one central anchoring points, (ii) a postulated structural flexibility, (iii) a negatively-charged $-\text{COO}^-$ termini that could act on the binding mode to minimize steric repulsion. It should be noted that all the experiments will consider a zwitterionic form of **P** at a pH around 7. As proteins co-crystallized with lanthanide complexes has revealed the possibility of a π -stacking between dipicolinate moieties and aromatic residues, a tyrosine has been included in the sequence (Y4).^{16,29} Thus, **P** can be considered as an intrinsically disordered peptide (IDP) with three expected anchorage points upon interaction with $[\text{Ln}(\text{DPA})_3]^{3-}$.

Methodology

NMR spectroscopy

The peptide **P** was purchased from the Protein Science Facility in Lyon (UMS3444). General procedures for the preparation of tris-dipicolinate lanthanide complexes ($[\text{Ln}(\text{DPA})_3] \cdot x\text{H}_2\text{O}$) ($\text{Ln} = \text{Tb}, \text{Gd}, \text{Pr}$ or Y)³⁰ are detailed elsewhere.²⁵ The peptide was dissolved in a sodium phosphate buffer at a pH ranging from 6.5 to 7. D_2O was added to the sample and 1,4-dioxane was used as an internal reference. Samples were prepared in 5 mm tubes with a peptide concentration of 2 mM. Solutions of $[\text{Na}]_3[\text{Ln}(\text{DPA})_3]$ in D_2O ($\text{Ln} = \text{Tb}, \text{Gd}, \text{Pr}$ or Y) were prepared at a concentration of 100 mM for the titration experiments.

NMR experiments were carried out on a Bruker Avance III 400 MHz spectrometer equipped with a Prodigy cryoprobe with a z-axis gradient coil. The temperature was regulated at 298 K.

1D ^1H , and 2D ^1H - ^1H TOCSY spectra were recorded to fully characterize the peptide at every step of the titration. 2D ROESY spectra were acquired to assess any kind of secondary structure in the peptide. 2D ^1H - ^{13}C HSQC spectra were acquired to characterize the peptide and for the observation of paramagnetic relaxation enhancements (PRE). All spectra were processed using Topspin 3.6 software.

2D ^1H - ^1H TOCSY spectra were recorded using a MLEV-17 spin-lock sequence with a mixing time of 70 ms and a wet solvent suppression scheme. Typically, spectra were acquired with 256 t_1 increments, 1024 data points, a relaxation delay of 0.8 s and 8 to 32 scans, giving an overall experimental time between 40 min and 160 min. All spectra were zero-filled in the F1 spectral dimension to 1024 data points followed by forward linear prediction of 400 points. The baseline of the FID was corrected using a Gaussian function to further suppress the residual water signal. Finally, a square sine bell window function (SSB = 3) was applied in both dimensions prior to Fourier transformation.

2D ^1H - ^1H ROESY spectra were recorded using a spin lock of 200 ms and excitation sculpting for solvent suppression. Typically, spectra were acquired with 256 t_1 increments, 2048 data points, a relaxation delay of 0.8 s and 32 scans, giving an overall experimental time of 3 h. All spectra were zero-filled in the F1 spectral dimension to 1024 data points followed by forward linear prediction of 512 points. Finally, a square cosine bell window function was applied in both dimensions prior to Fourier transformation.

2D ^1H - ^{13}C HSQC spectra were recorded with a standard phase sensitive edited HSQC sequence using gradients and adiabatic pulses. Typically, spectra were acquired with 256 t_1 increments, 1024 data points, a relaxation delay of 1 s and 64 scans, giving an overall experimental time of 5 h. All spectra were zero-filled in the F1 spectral dimension to 1024 data points followed by forward linear prediction of 400 points. The baseline of the FID was corrected using a Gaussian function to further suppress the residual water signal. Finally, a square cosine bell window function was applied in both dimensions prior to Fourier transformation.

Molecular dynamics simulations

Explicit solvent, all-atom molecular dynamics simulations were performed by using the Amber18 software package,³¹ after parametrization of the tris-dipicolinate lanthanide complex enantiomers based on the metal center parameters builder (MCPB) approach proposed for organometallic compounds by Li and Merz.³² The decapeptide **P** was built using the *tleap* available within *Ambertools*. Standard Amber force fields were applied: ff14SB³³ for the decapeptide and GAFF parameters for the ligand $[\text{Y}(\text{DPA})_3]^{3-}$. Within the MCPB³² method, the structure of the complex was optimized at the DFT-B3LYP/6-31G(d) level of theory by using the Gaussian³⁴ program, and the RESP charge assignment leads to a charge of 0.43e on the Y atom. The van der Waals radius was set up to 1.602 Å (ReadRadii keyword) Å, in agreement with previous values in the literature. This choice would be the same for an yttrium atom, and it is

important to stress here that we discard the role of the lanthanide center as the coordination takes place in the second sphere.

The decapeptide **P**, isolated or interacting with the Δ or Λ enantiomers of the $[\text{Y}(\text{DPA})_3]^{3-}$ complex, was simulated using the same computational protocol. The systems were explicitly solvated using TIP3P water in truncated octahedron boxes, with sodium (Na^+) and chloride (Cl^-) ions corresponding to a salt concentration of 0.2 M. For all the simulation boxes, minimization was performed including 5000 steps of steepest descent and 5000 steps of conjugate gradient. Then, the temperature was increased from 0 to 300 K in a 30 ps thermalization run (NVT), followed by a 1 ns equilibration performed in NPT conditions. During the rest of the simulation, the temperature was kept constant at 300 K using the Langevin thermostat with a collision frequency γ_{in} equal to 1 ps^{-1} . Particle Mesh Ewald (PME) method was used to treat long-range interaction. During the equilibration and production run phases, a cut off of 10 Å was used. The bonds involving hydrogens were treated with the SHAKE constraints algorithm. For both enantiomers, four independent trajectories of 1 μs with different initial velocities were run (thus 4 μs in total), while for **P** alone, only one of 500 ns. Cpptraj module was used to perform cluster analysis, calculations of the distances and evaluation of surface accessible solvent area (SASA). The binding free energy ΔG_{bind} between **P** and both enantiomers of the tris-dipicolinate complex was evaluated through the attach-pulling-release (APR³⁵) method (see ESI†).

Results and discussion

NMR study

P was fully characterized in solution using 2D ^1H - ^1H TOCSY, NOESY, and ^{13}C - ^1H HSQC experiments (the assignment of proton shifts as well as the NMR spectra recorded on **P** are shown in Fig. S1 and Table S1, ESI†). The ROESY spectra did not show any correlation suggesting a stable secondary structure (Fig. S2 and S3, ESI†). Four lanthanide ions (Terbium, Gadolinium, Yttrium and Praseodymium) were then chosen to probe the interaction process between **P** and $[\text{Ln}(\text{DPA})_3]^{3-}$. A series of 2D ^1H - ^1H TOCSY or ^{13}C - ^1H HSQC spectra was acquired on a peptide sample to which we added the lanthanide complex, for $[\text{Ln}(\text{DPA})_3]^{3-}$:**P** ratios ranging from 0.2 to 5 ($\text{Ln} = \text{Tb, Gd, Pr or Y}$).

We first used a Terbium complex to exploit the strong paramagnetic shifts induced by this metal even at a long distance.³⁶ Upon addition of $[\text{Tb}(\text{DPA})_3]^{3-}$, we indeed observe a significant variation in most of the proton shifts in **P** (Fig. 2). We find that the amplitude of this variation increases with the amount of $[\text{Tb}(\text{DPA})_3]^{3-}$. Although at the highest ratio some proton signals are significantly broadened due to Paramagnetic Relaxation Enhancement (PRE) induced by the Terbium center, their assignment was still possible without any ambiguity (see ESI† Table S2 for chemical shift and chemical shift variations of all proton resonances). Overall, these data show that **P** and $[\text{Tb}(\text{DPA})_3]^{3-}$ are interacting.

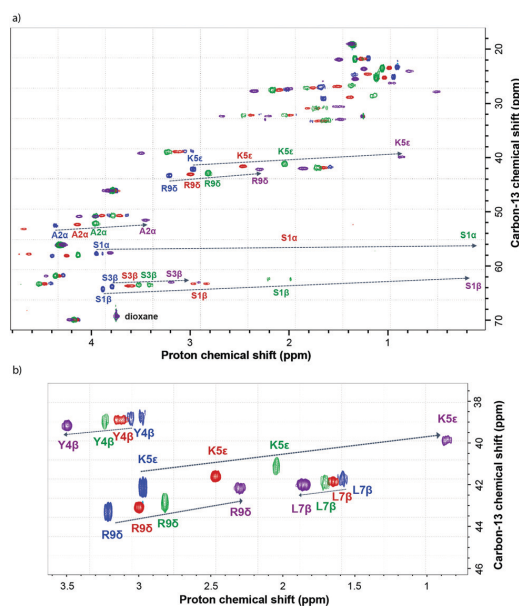


Fig. 2 (a) ^1H - ^{13}C HSQC spectra recorded on the peptide sample (blue), and the peptide interacting with 0.5 (red), 1 (green) and 3 (purple) equivalents of $[\text{Tb}(\text{DPA})_3]^{3-}$. (b) zoom on the region between 44 and 38 ppm for ^{13}C . Assigned signals show some of the most significant chemical shift variations.

Moreover, the observation of a unique set of ^1H - ^{13}C correlations with a characteristic linear shift reflects a fast exchange process between a free state and a bound state resulting from the interaction between **P** and $[\text{Tb}(\text{DPA})_3]^{3-}$.

We remind here that the paramagnetic shift δ_{para} induced for any proton in **P** by the interaction with a paramagnetic complex is defined through the equation:

$$\delta_{\text{para}} = \delta_{\text{para}}^{\text{bound}} - \delta_{\text{dia}}^{\text{bound}} \quad (1)$$

where $\delta_{\text{para}}^{\text{bound}}$ is the chemical shift of the proton in the presence of the paramagnetic complex and $\delta_{\text{dia}}^{\text{bound}}$ is the chemical shift in the presence of the same complex incorporating a diamagnetic lanthanide metal. $\delta_{\text{dia}}^{\text{bound}}$ accounts for the conformational change induced in the molecule that is interacting with the paramagnetic compound. Furthermore, δ_{para} is the sum of two contributions called Fermi contact and pseudo-contact shifts. The Fermi contact comes from a through-bond interaction and is negligible in most situations.³⁶ Herein, the paramagnetic shift may be interpreted as the pseudo-contact shift, which depends both on the distance of the spin to the paramagnetic center and on the orientation of the paramagnetic complex with respect to the interacting molecule.³⁷ For a fast exchange process, $\delta_{\text{para}}^{\text{bound}}$ and $\delta_{\text{dia}}^{\text{bound}}$ can be determined by fitting the model curve corresponding to the relevant interaction mechanism to the shifts measured upon titration.³⁸

In the present case, we could model the observed shifts evolutions by an equilibrium between a free and a “bound” form, which we refer to as 1 : 1 equilibrium. An average affinity constant $K_d = 8 \pm 2$ mM could be determined from the analysis of the titration curves recorded for the different protons in **P**. To confirm this result, praseodymium was selected to monitor the evolution of the diffusion coefficient of the interacting species upon addition of $[\text{Ln}(\text{DPA})_3]^{3-}$. This method has proven to be a complementary technique to chemical shift titration experiments.²⁵ The evolution of the observed diffusion coefficient for the peptide is also in good agreement with a 1 : 1 equilibrium, yielding a similar affinity constant value $K_d = 7$ mM. We note however that it was not possible to exploit the diffusion data recorded for the complex, because the overall high fraction of the complex in the sample throughout the titration experiment leads to a weak variation in the observed diffusion coefficient for this molecule.

The analysis of the data recorded with the paramagnetic Terbium complex allowed for determining the paramagnetic shift in the bound form $\delta_{\text{Tb}}^{\text{bound}}$. Finally, the same titration experiment was carried out using $[\text{Y}(\text{DPA})_3]^{3-}$, which allowed for determining the diamagnetic contribution $\delta_{\text{Y}}^{\text{bound}}$ in order to throw off the contribution to the observed shift variation of the conformational changes induced in **P** upon supramolecular interactions (see ESI,† Table S3 and Fig. S4, S5 for the analysis of titration and diffusion NMR experiments using a 1 : 1 equilibrium). Fig. 3 shows the evolution of the apparent paramagnetic shift $\delta_{\text{para}} = \delta_{\text{Tb}}^{\text{bound}} - \delta_{\text{Y}}^{\text{bound}}$ that was determined for the different protons in **P** when it is interacting with $[\text{Tb}(\text{DPA})_3]^{3-}$.

The largest δ_{para} values are observed for Serine S1 protons, followed by Lysine K5(ϵ) and K5(δ) protons, at the extremity of the side chain, and Serine S3(HN) amide proton. We note however that for Arginine R9 lateral chain, which is expected to interact closely with the lanthanide complex,²⁴ we observe a rather weak δ_{para} value. Two interpretations can be considered: (i) Arginine R9 actually does not interact with the lanthanide complex, or (ii) it is interacting, but a dynamic process averages the paramagnetic shift that can be detected for this residue.

Furthermore, the Gadolinium complex was used to probe Paramagnetic Relaxation Enhancements (PREs) throughout the peptide structure. Although they do not induce any chemical shift changes, Gadolinium ions are known to lead to strong

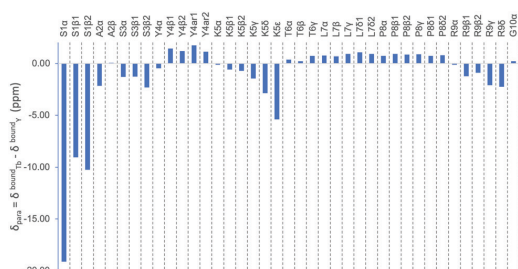


Fig. 3 ^1H shifts variations $\delta_{\text{Tb}}^{\text{bound}} - \delta_{\text{Y}}^{\text{bound}}$ determined for all observed protons in **P** upon interaction with $[\text{Na}]_3[\text{Ln}(\text{DPA})_3]^{3-}$ ($\text{Ln} = \text{Tb}, \text{Y}$).

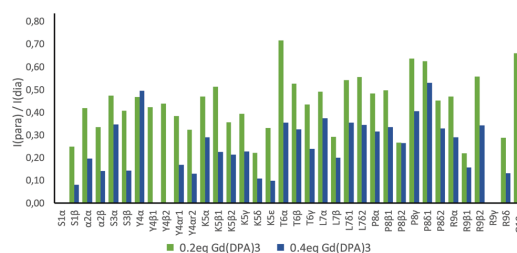


Fig. 4 Relative intensity peak ratio ($I_{\text{para}}/I_{\text{dia}}$) in the ^1H - ^{13}C HSQC spectrum of a solution of 1 mM of **P** upon the addition of 0.2 (medium green) or 0.4 (dark blue) equivalents of $[\text{Na}]_3[\text{Gd}(\text{DPA})_3]^{3-}$. The intensity of the HSQC in the absence of any lanthanide complex is considered a good approximation of I_{dia} . L7 γ is not shown because of a strong overlapping with K5 δ .

PREs that mainly depend on the distance between the nuclear spin and the paramagnetic center. We have thus acquired ^1H - ^{13}C HSQC experiments on a 1 mM peptide solution with 0, 0.2 and 0.4 equivalents of $[\text{Gd}(\text{DPA})_3]^{3-}$ to measure PREs over a broad range of distances.³⁹ The evolution of the peak ratio $I_{\text{para}}/I_{\text{dia}}$ calculated for the different C-H correlations belonging to **P** is shown in Fig. 4, for two different numbers of equivalents of $[\text{Na}]_3[\text{Gd}(\text{DPA})_3]^{3-}$.

Overall, we observe that the Gadolinium complex in solution induces a broadening of all the lines as reflected by the value of the $I_{\text{para}}/I_{\text{dia}}$ ratios that are all below 80%. We also note that this broadening is not uniform. Some residues are indeed more impacted than others as illustrated by the $I_{\text{para}}/I_{\text{dia}}$ ratios determined for 0.2 equivalent that show the disappearance of the S1(α) and R9(γ) protons signals. This increased PRE shows that some proton sites have been in closer contact with the paramagnetic center. The analysis of the PRE distributions at 0.2 and 0.4 equivalents thus suggests that residues S1 and R9 are directly interacting with the lanthanide complex, as well as the region Y4–K5.

From the NMR study, we can conclude that we observe and quantify the interaction between **P** and the lanthanide complex $[\text{Ln}(\text{DPA})_3]^{3-}$, which gives rise to a fast exchange process on the NMR timescale. The analysis of the PCS and PRE data highlight three regions that are in close contact with the complex: S1, Y4–K5, and R9. We remark however that the PCS values that are obtained for some residues suggest that the flexibility of **P** during the interaction process should be accounted for in order to fully explain them. To gain further insight into this system, in the following section we perform molecular dynamics simulations to unveil the dynamic features of the interaction process.

Molecular dynamics simulations of the decapeptide **P** and impact of binding with $[\text{Ln}(\text{DPA})_3]^{3-}$

We first explored the structure of the explicitly-solvated decapeptide **P** to probe structural changes upon binding with the ligand. This decapeptide features two residues with a positively-charged side chain, Lysine K5 and Arginine R9 (boldfaced in green in Fig. 1). The decapeptide **P** that was used

in the NMR experiments is not capped at the N- and C-termini, leading to $-\text{NH}_3^+$ and $-\text{COO}^-$ terminal functional groups of Serine S1 and Glycine G10 that also play a role in defining the structure of **P**. Accordingly, **P** was left uncapped in our simulations. With two positive charged residues, two uncapped and polar ones prone to hydrogen bonding, **P** can be considered as a good test case to delineate a competition as one, two (eventually the three) residues could interact with the carboxylate arms of the dipicolinate moiety, as suggested by the experimental NMR study.

As expected for an intrinsically-disordered peptide, **P** on its own spans a large number of structures. This is reflected in the distribution of the head-to-tail ($D_{\text{h-t}}$) interatomic distance measured between the carbon atoms of the N- and C-termini S1(α) and G10(α) with an average value of 17.2 ± 5.7 Å (Fig. 5). The third cluster provides an example of a more compact fold of **P**, with a distance of 4.92 Å, owing to the formation of a salt bridge between S1 and G10. This structure is representative of the low-populated first peak at 5.5 Å (green line, Fig. 5). Moreover, transient intermolecular hydrogen bonds between O:S3...H:L7 and O:Y4...H:T6 contribute to the folding of the decapeptide **P**.

The association between the tris-dipicolinate complex (charged -3) and the decapeptide **P** was then probed by molecular dynamics simulations, with two series of four trajectories of 1 μs , one series for the Δ enantiomer and one series for the Λ enantiomer, as reported in Table S4 (ESI†). The decapeptide **P** offers *a priori* at least three anchorage points upon interaction with $[\text{Y}(\text{DPA})_3]^{3-}$ to trigger its “wrapping” upon binding with the tris-dipicolinate lanthanide.

This fold can be seen by the decrease on the $D_{\text{h-t}}$ value (14.3 and 14.8 Å for the adducts **P- Δ** and **P- Λ** , respectively), as reported in Fig. 5 and Table S4 (ESI†). The non-covalent interactions between **P** and the tris-dipicolinate lanthanide complex can also be quantified as associative by the decreasing values of SASA of **P** with respect to the intrinsic value 1196 Å² (**P** alone).

The most populated structures obtained from clusters analysis (46.0% and 37.4% for the Λ and Δ enantiomers respectively), shown on the left side of Fig. 6, correspond to

an interaction of the tris-dipicolinate complex with S1 and R9, whereas the central lysine K5 is solvent exposed.

The other clusters, accounting more 40–50% of the total population correspond to an alternation of S1, K5 and R9 as two of them bind the tris-dipicolinate complex. Fig. 7 provides the time evolution of three interatomic distances between the lanthanide ion and the centers of mass of the three residues S1, K5 and R9. It characterizes a highly dynamic association, as the positively charged residues regularly swap to anchor the lanthanide complex. Interaction with the N-terminal Serine S1 occurs through its uncapped $-\text{NH}_3^+$ group, which is prone to interact with a carboxylate oxygen of the tris-dipicolinate complex (the oxygen not bounded to the lanthanide ion). The binding of the lanthanide complex with R9 corresponds to an electrostatic interaction, reinforced by a π -stacked mode (see the third clusters in Fig. 6b and c). Interaction with the lysine K5 involves its NH_3^+ end group and the oxygen of the carboxylate. It is interesting to note that only one cluster, only for the Δ enantiomer, only weakly populated with an occupation of 13.5%, features the three interactions at the same time. This compact fold is barely observed for the Λ enantiomer.

This indicates that the decapeptide **P** is too short and too dynamic to afford a stable association mode where the three-positively charged groups bind the trianionic complex. Other residues transiently do not interact, or interact sparsely, with the tris-dipicolinate complex: Y4, the only aromatic residue of **P**, opportunistically π -stacks with dipicolinate moieties (*ca.* 5% over time). Several, competitive non-covalent interactions can also trigger a partial folding with more compact conformations of **P**: a π -stacking between Y4 and K5 (*ca.* 50% of the trajectory, see Fig. S8, ESI†), and an hydrogen bond interaction between O:S1...H:L7 and O:S1...H:T6.

The structural inspection at the microsecond time range proves a highly dynamic and versatile interaction mode as $[\text{Ln}(\text{DPA})_3]^{3-}$ interacts with **P**. Overall, we observe that the two enantiomers of the lanthanide complex behave structurally very similarly upon association with **P**. This is confirmed by the calculated absolute free energy ΔG_{bind} , which is found similar for the two enantiomers, with values of -5.0 ± 0.6 and -6.3 ± 0.7 kcal mol⁻¹ (see Table S4, ESI†).

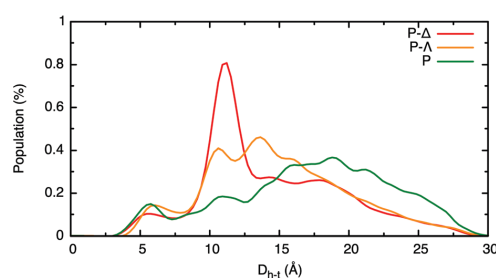


Fig. 5 Overall simulation time head-tail distance $D_{\text{h-t}}$ in Å, between the carbon atoms of S1(α) and G10(α), reported as normalized histograms. The systems are represented as follows: red line for **P- Δ** , orange line for **P- Λ** and green line for the peptide **P** isolated.

Discussion

At this step it is interesting to draw up the overall landscape of the interaction process, as it can be addressed by the combination of NMR spectroscopy and MD simulations. On the one hand, it should be noted that both approaches have identified 3 major interaction sites along **P** that are residues S1, K5 and R9, but also a contribution from the Tyrosine Y4. In particular, there is a good agreement on the fact that S1 is interacting *via* the NH_3^+ group on its backbone, whereas for K5 and R9 their sidechain is coming into play. This atomic scale analysis is validated by both the distances measurements reported by MD, and the PCS and PRE perturbations probed by NMR. On the other hand, NMR and MS offer a complementary insight into the dynamic features of these

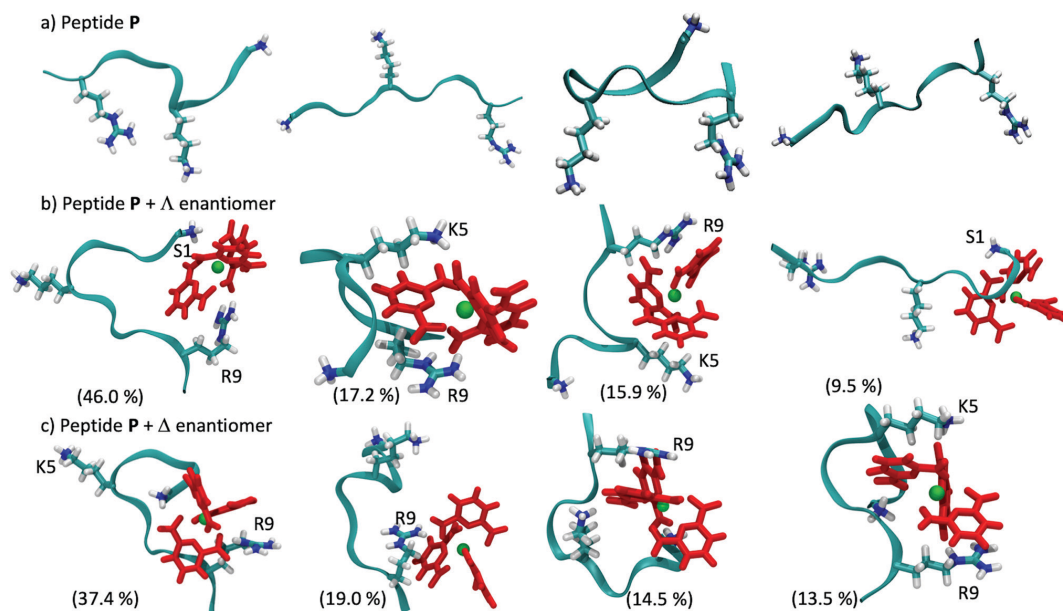


Fig. 6 Four representative structures for **P**, isolated, interacting with the Δ or Λ enantiomer of $[Y(DPA)_3]^{3-}$ obtained from cluster analysis of all trajectories (population percentages are given in brackets). The water box and part of the hydrogen atoms are omitted for the sake of clarity. The lanthanide central ion is shown as a green sphere, the dipicolinate ligands are shown in red.

supramolecular interactions. From the NMR point of view, the data extracted from the titration experiments are consistent with a 1:1 equilibrium in the fast exchange regime. Moreover, MD simulations suggest that this “bound” state should not be seen as a rigid, unique adduct, but results from a dynamic association between the lanthanide complex and **P**. The computed trajectories describe an interaction scenario with one highly populated structure (for each enantiomer) where $[Ln(DPA)_3]^{3-}$ interacts with S1 and R9, and a series of less populated –transient– structures corresponding to weaker interaction modes, where the complex alternatively interacts with S1, K5 and R9. This dynamic picture is useful to qualitatively explain the fluctuations in the PREs that were determined using the gadolinium complex.

In Fig. 8, the relative peak-intensity ratio ($I(\text{para})/I(\text{dia})$), which reflects the PRE, is plotted as a function of the distance to the lanthanide center for the different proton sites in the peptide. It is noticeable that the protons with the strongest attenuation (hence the highest PRE value) are located on parts of the residues S1 and R9 that are directly interacting with the lanthanide complex in the most populated structure. Conversely, for the residues S3, T6, L7, P8 which are not key actors of the interaction process, we see higher ratios, with the general trend of the longer the distance, the higher the ratio (hence the smaller the PRE value). It is interesting to note that a third group of protons can be highlighted for K5 and Y4, with a longer mean distance and a rather small peak-intensity ratio. These protons belong to the side chain of these residues that are interacting with the complex.

The rather small value of their peak-intensity ratio can be interpreted as arising from the fact that these protons spend time in close contact with the gadolinium metal, whereas the mean distance value that is rather long for such peak-intensity ratio, can be explained by the fact that they belong to a highly flexible region of **P**, which explores a broad conformational space.

From these observations, it can be assumed that if on the time scale of the NMR experiment this system can be seen as 1:1 equilibrium undergoing a fast exchange process, MD simulations allow for addressing the fate of the “bound” state on a shorter time scale. The positioning of Tyrosine Y4 is interesting in that respect: our MD simulations characterize a p-cation interaction with the Lysine K5 side chain, with a low proximity to the lanthanide center (conformations for which the interatomic distance towards the center of mass of the Tyrosine Y4 is lower than 8 Å are populated to 10.0%). Even with a low population, such structures (shown in Fig. S9, ESI†) could explain the signals observed on the NMR experiments. The dynamic association between the lanthanide complex and the peptide **P** leads to an averaging of the NMR measurements that can be performed on this “bound” state, as it is illustrated by the affinity constant that can be extracted from titration experiments. We note that such averaging of PCS and PRE values upon interaction with a flexible system has already been reported.⁴⁰ The experimental Gibbs energy that can be evaluated from this affinity constant ($\Delta G = -2.9 \pm 0.2 \text{ kcal mol}^{-1}$), and the agreement with the computational estimation (-5.0 and $-6.3 \text{ kcal mol}^{-1}$) is encouraging: the overestimation based on

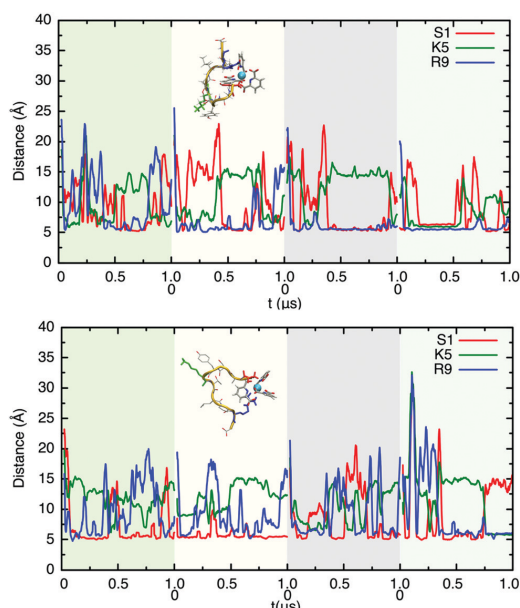


Fig. 7 Time evolution of the distances (in Å) between S1, K5 and R9 centers of mass and the central lanthanide ion (green sphere) for P-Δ (upper panel) and P-Λ (lower panel) supramolecular adducts, along the four independent trajectories (collated). The averaged values are reported in Table S4 (ESI†) for all four different simulations.

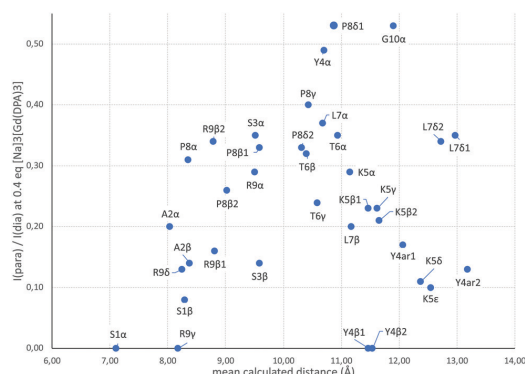


Fig. 8 Correlation between the mean calculated distance from the different protons in **P** to the lanthanide complex calculated from the MD simulation, and the experimental relative peak-intensity ratios $I(\text{para})/I(\text{dia})$ measured for the corresponding C–H correlations upon addition of 0.4 eq. of $[\text{Na}]_3[\text{Gd}(\text{DPA})_3]$.

all-atom MD simulations is expected here, due to the lack of polarizable force fields or the lack of sampling non-bounded states. A more integrated view on the free energy signature of peptide/lanthanide adduct will require more advanced exploration.

Conclusions

We report a combined NMR-molecular dynamics exploration of the highly dynamical association of a test decapeptide with the $[\text{Ln}(\text{DPA})_3]^{3-}$ complex. Unlike what one could have anticipated, even this electrostatically driven system presents a non-trivial association mode, highly dynamic, which can be captured by the crosstalk between molecular dynamics and paramagnetic NMR. On the ns to μs timescale, MD simulations reveal that 3 residues in the peptide interact non-simultaneously with the lanthanide complex, leading to one main structure alternating with less populated “bound” states with higher flexibility. These transient states are interconverting rapidly on the timescale that is relevant to NMR, hereby leading to the observation of an average “bound” state that is itself in fast exchange with a free state. Such complex picture of a supramolecular interaction process can only be addressed by the combination of NMR and MD, which both offer an atomic resolution insight of the interacting species, on complementary timescales.

We believe that this approach will be useful to address more complex supramolecular systems such as the nucleation steps that are preceding several aggregation or crystallization processes, because they involve transient species that can neither be captured in solution before the nucleation starts. These results open the way to the study of a broad range of molecular scaffolds, from proteins to amyloid peptides, where MD simulations could become an interesting way of pre-screening new systems before carrying out an NMR exploration. The development of methods to increase the analytical potential of this approach is in progress in our groups.

Conflicts of interest

There are no conflicts to declare.

Acknowledgements

Classical MD simulations were performed using the resources of the Pole Scientifique de Modélisation Numériques (PSMN). A. B. is grateful for a post-doctoral grant awarded by the Fondation Maison de la Chimie (FMC). The authors thank the SYSPROD project and AXELERA Pôle de Compétitivité for financial support (PSMN Data Center). The authors would like to thank S. Megy (IBCP, Université de Lyon) for helpful discussions.

References

- 1 B. R. Sculimbrene and B. Imperiali, Lanthanide-Binding Tags as Luminescent Probes for Studying Protein Interactions, *J. Am. Chem. Soc.*, 2006, **128**(22), 7346–7352, DOI: 10.1021/ja061188a.
- 2 S. C. J. Meskers and H. P. J. M. Dekkers, Enantioselective Quenching of Luminescence: Molecular Recognition of Chiral Lanthanide Complexes by Biomolecules in Solution,

- J. Phys. Chem. A*, 2001, **105**(19), 4589–4599, DOI: 10.1021/jp004428w.
- 3 H. Tsukube and S. Shinoda, Lanthanide Complexes in Molecular Recognition and Chirality Sensing of Biological Substrates, *Chem. Rev.*, 2002, **102**(6), 2389–2404, DOI: 10.1021/cr010450p.
- 4 R. Jastrzab, M. Nowak, M. Skrobańska, A. Tolińska, M. Zabiszak, M. Gabryel, Ł. Marciniak and M. T. Kaczmarek, DNA as a Target for Lanthanide(III) Complexes Influence, *Coord. Chem. Rev.*, 2019, **382**, 145–159, DOI: 10.1016/j.ccr.2018.12.018.
- 5 M. Rajendran, E. Yapici and L. W. Miller, Lanthanide-Based Imaging of Protein–Protein Interactions in Live Cells, *Inorg. Chem.*, 2014, **53**(4), 1839–1853, DOI: 10.1021/ic4018739.
- 6 K. Y. Zhang, Q. Yu, H. Wei, S. Liu, Q. Zhao and W. Huang, Long-Lived Emissive Probes for Time-Resolved Photoluminescence Bioimaging and Biosensing, *Chem. Rev.*, 2018, **118**(4), 1770–1839, DOI: 10.1021/acs.chemrev.7b00425.
- 7 J.-C. G. Bünzli, Lanthanide Luminescence for Biomedical Analyses and Imaging, *Chem. Rev.*, 2010, **110**(5), 2729–2755, DOI: 10.1021/cr900362e.
- 8 R. Carr, N. H. Evans and D. Parker, Lanthanide Complexes as Chiral Probes Exploiting Circularly Polarized Luminescence, *Chem. Soc. Rev.*, 2012, **41**(23), 7673–7686, DOI: 10.1039/C2CS35242G.
- 9 É. Girard, M. Stelter, J. Vicat and R. Kahn, A New Class of Lanthanide Complexes to Obtain High-Phasing-Power Heavy-Atom Derivatives for Macromolecular Crystallography, *Acta Crystallogr., Sect. D: Biol. Crystallogr.*, 2003, **59**(11), 1914–1922, DOI: 10.1107/S0907444903020511.
- 10 N. R. Silvaggi, L. J. Martin, H. Schwalbe, B. Imperiali and K. N. Allen, Double-Lanthanide-Binding Tags for Macromolecular Crystallographic Structure Determination, *J. Am. Chem. Soc.*, 2007, **129**(22), 7114–7120, DOI: 10.1021/ja070481n.
- 11 G. Pompidor, A. D'Aléo, J. Vicat, L. Toupet, N. Giraud, R. Kahn and O. Maury, Protein Crystallography through Supramolecular Interactions between a Lanthanide Complex and Arginine, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2008, **47**(18), 3388–3391, DOI: 10.1002/anie.200704683.
- 12 S. Engilberge, F. Riobé, S. Di Pietro, L. Lassalle, N. Coquelle, C.-A. Arnaud, D. Pitrat, J.-C. Mulatier, D. Madern, C. Breyton, O. Maury and E. Girard, Crystallophore: A Versatile Lanthanide Complex for Protein Crystallography Combining Nucleating Effects, Phasing Properties, and Luminescence, *Chem. Sci.*, 2017, **8**(9), 5909–5917, DOI: 10.1039/C7SC00758B.
- 13 R. E. McGovern, S. C. Feifel, F. Lisdat and P. B. Crowley, Microscale Crystals of Cytochrome *c* and Calixarene on Electrodes: Interprotein Electron Transfer between Defined Sites, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2015, **54**(21), 6356–6359, DOI: 10.1002/anie.201500191.
- 14 M. L. Rennie, G. C. Fox, J. Pérez and P. B. Crowley, Auto-Regulated Protein Assembly on a Supramolecular Scaffold, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2018, **57**(42), 13764–13769, DOI: 10.1002/anie.201807490.
- 15 J. Gruszczyk, A. Fleurie, V. Olivares-Illana, E. Béchet, I. Zanella-Cleon, S. Moréra, P. Meyer, G. Pompidor, R. Kahn, C. Grangeasse and S. Nessler, Structure Analysis of the Staphylococcus Aureus UDP-N-Acetyl-Mannosamine Dehydrogenase Cap50 Involved in Capsular Polysaccharide Biosynthesis, *J. Biol. Chem.*, 2011, **286**(19), 17112–17121, DOI: 10.1074/jbc.M110.216002.
- 16 S. Engilberge, F. Riobé, T. Wagner, S. Di Pietro, C. Breyton, B. Franzetti, S. Shima, E. Girard, E. Dumont and O. Maury, Unveiling the Binding Modes of the Crystallophore, a Terbium-Based Nucleating and Phasing Molecular Agent for Protein Crystallography, *Chem. – Eur. J.*, 2018, **24**(39), 9739–9746, DOI: 10.1002/chem.201802172.
- 17 S. Engilberge, T. Wagner, G. Santoni, C. Breyton, S. Shima, B. Franzetti, F. Riobé, O. Maury and E. Girard, Protein Crystal Structure Determination with the Crystallophore, a Nucleating and Phasing Agent, *J. Appl. Crystallogr.*, 2019, **52**(4), 722–731, DOI: 10.1107/S1600576719006381.
- 18 M. Allegrozzi, I. Bertini, M. B. L. Janik, Y.-M. Lee, G. Liu and C. Luchinat, Lanthanide-Induced Pseudocontact Shifts for Solution Structure Refinements of Macromolecules in Shells up to 40 Å from the Metal Ion, *J. Am. Chem. Soc.*, 2000, **122**(17), 4154–4161, DOI: 10.1021/ja993691b.
- 19 X. Jia, H. Yagi, X.-C. Su, M. Stanton-Cook, T. Huber and G. Otting, Engineering [Ln(DPA)₃]³⁺ Binding Sites in Proteins: A Widely Applicable Method for Tagging Proteins with Lanthanide Ions, *J. Biomol. NMR*, 2011, **50**(4), 411, DOI: 10.1007/s10858-011-9529-x.
- 20 I. Bertini, C. Luchinat, G. Parigi and R. Pierattelli, NMR Spectroscopy of Paramagnetic Metalloproteins, *ChemBioChem*, 2005, **6**(9), 1536–1549, DOI: 10.1002/cbic.200500124.
- 21 T. Saio, M. Yokochi, H. Kumeta and F. Inagaki, PCS-Based Structure Determination of Protein–Protein Complexes, *J. Biomol. NMR*, 2010, **46**(4), 271–280, DOI: 10.1007/s10858-010-9401-4.
- 22 C. Schmitz, R. Vernon, G. Otting, D. Baker and T. Huber, Protein Structure Determination from Pseudocontact Shifts Using ROSETTA, *J. Mol. Biol.*, 2012, **416**(5), 668–677, DOI: 10.1016/j.jmb.2011.12.056.
- 23 K. Tu and M. Gochin, Structure Determination by Restrained Molecular Dynamics Using NMR Pseudocontact Shifts as Experimentally Determined Constraints, *J. Am. Chem. Soc.*, 1999, **121**(40), 9276–9285, DOI: 10.1021/ja9904540.
- 24 E. Dumont, G. Pompidor, A. D'Aléo, J. Vicat, L. Toupet, R. Kahn, E. Girard, O. Maury and N. Giraud, Exploration of the Supramolecular Interactions Involving Tris-Dipicolinate Lanthanide Complexes in Protein Crystals by a Combined Biostructural, Computational and NMR Study, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2013, **15**(41), 18235–18242, DOI: 10.1039/C3CP53671H.
- 25 S. Denis-Quanquin, F. Riobé, M.-A. Delsuc, O. Maury and N. Giraud, Paramagnetic DOSY: An Accurate Tool for the Analysis of the Supramolecular Interactions between Lanthanide Complexes and Proteins, *Chem. – Eur. J.*, 2016, **22**(50), 18123–18131, DOI: 10.1002/chem.201603460.

- 26 Z. Wei, Y. Yang, Q.-F. Li, F. Huang, H.-H. Zuo and X.-C. Su, Noncovalent Tagging Proteins with Paramagnetic Lanthanide Complexes for Protein Study, *Chem. – Eur. J.*, 2013, **19**(18), 5758–5764, DOI: 10.1002/chem.201204152.
- 27 X.-C. Su, H. Liang, K. V. Loscha and G. Otting, $[\text{Ln}(\text{DPA})_3]^{3-}$ Is a Convenient Paramagnetic Shift Reagent for Protein NMR Studies, *J. Am. Chem. Soc.*, 2009, **131**(30), 10352–10353, DOI: 10.1021/ja9034957.
- 28 N. Ouali, B. Bocquet, S. Rigault, P.-Y. Morgantini, J. Weber and C. Piguet, Analysis of Paramagnetic NMR Spectra of Triple-Helical Lanthanide Complexes with 2,6-Dipicolinic Acid Revisited: A New Assignment of Structural Changes and Crystal-Field Effects 25 Years Later, *Inorg. Chem.*, 2002, **41**(6), 1436–1445, DOI: 10.1021/ic010801i.
- 29 R. Talon, L. Nauton, J.-L. Canet, R. Kahn, E. Girard and A. Gautier, Clicked Europium Dipicolinate Complexes for Protein X-Ray Structure Determination, *Chem. Commun.*, 2012, **48**(97), 11886–11888, DOI: 10.1039/C2CC36982F.
- 30 N. Tancrez, C. Feuvrie, I. Ledoux, J. Zyss, L. Toupet, H. Le Bozec and O. Maury, Lanthanide Complexes for Second Order Non-linear Optics: Evidence for the Direct Contribution of f Electrons to the Quadratic Hyperpolarizability, *J. Am. Chem. Soc.*, 2005, **127**(39), 13474–13475, DOI: 10.1021/ja054065j.
- 31 D. A. Case, T. E. Cheatham III, T. Darden, H. Gohlke, R. Luo, K. M. Merz Jr., A. Onufriev, C. Simmerling, B. Wang and R. J. Woods, The Amber Biomolecular Simulation Programs, *J. Comput. Chem.*, 2005, **26**(16), 1668–1688, DOI: 10.1002/jcc.20290.
- 32 P. Li and K. M. Merz, MCPB.Py: A Python Based Metal Center Parameter Builder, *J. Chem. Inf. Model.*, 2016, **56**(4), 599–604, DOI: 10.1021/acs.jcim.5b00674.
- 33 J. A. Maier, C. Martinez, K. Kasavajhala, L. Wickstrom, K. E. Hauser and C. Simmerling, Ff14SB: Improving the Accuracy of Protein Side Chain and Backbone Parameters from Ff99SB, *J. Chem. Theory Comput.*, 2015, **11**(8), 3696–3713, DOI: 10.1021/acs.jctc.5b00255.
- 34 M. J. Frisch; G. W. Trucks; H. B. Schlegel; G. E. Scuseria; M. A. Robb; J. R. Cheeseman; G. Scalmani; V. Barone; G. A. Petersson; H. Nakatsuji; X. Li; M. Caricato; A. V. Marenich; J. Bloino; B. G. Janesko; R. Gomperts; B. Mennucci; H. P. Hratchian; J. V. Ortiz; A. F. Izmaylov; J. L. Sonnenberg; D. Williams-Young; F. Ding; F. Lipparini; F. Egidi; J. Goings; B. Peng; A. Petrone; T. Henderson; D. Ranasinghe; V. G. Zakrzewski; J. Gao; N. Rega; G. Zheng; W. Liang; M. Hada; M. Ehara; K. Toyota; R. Fukuda; J. Hasegawa; M. Ishida; T. Nakajima; Y. Honda; O. Kitao; H. Nakai; T. Vreven; K. Throssell; J. A. Montgomery, Jr.; J. E. Peralta; F. Ogliaro; M. J. Bearpark; J. J. Heyd; E. N. Brothers; K. N. Kudin; V. N. Staroverov; T. A. Keith; R. Kobayashi; J. Normand; K. Raghavachari; A. P. Rendell; J. C. Burant; S. S. Iyengar; J. Tomasi; M. Cossi; J. M. Millam; M. Klene; C. Adamo; R. Cammi; J. W. Ochterski; R. L. Martin; K. Morokuma; O. Farkas; J. B. Foresman and D. J. Fox, *Gaussian – 16 Revision B.01*, 2016.
- 35 J. Yin, N. M. Henriksen, D. R. Slochower and M. K. Gilson, The SAMPL5 Host–Guest Challenge: Computing Binding Free Energies and Enthalpies from Explicit Solvent Simulations by the Attach–Pull–Release (APR) Method, *J. Comput.-Aided Mol. Des.*, 2017, **31**(1), 133–145, DOI: 10.1007/s10822-016-9970-8.
- 36 G. Pintacuda, M. John, X.-C. Su and G. Otting, NMR Structure Determination of Protein–Ligand Complexes by Lanthanide Labeling, *Acc. Chem. Res.*, 2007, **40**(3), 206–212, DOI: 10.1021/ar050087z.
- 37 C. Nitsche and G. Otting, Pseudocontact Shifts in Biomolecular NMR Using Paramagnetic Metal Tags, *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.*, 2017, **98–99**, 20–49, DOI: 10.1016/j.pnmrs.2016.11.001.
- 38 L. Fielding, NMR Methods for the Determination of Protein–Ligand Dissociation Constants, *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.*, 2007, **51**(4), 219–242, DOI: 10.1016/j.pnmrs.2007.04.001.
- 39 H. Yagi, K. V. Loscha, X.-C. Su, M. Stanton-Cook, T. Huber and G. Otting, Tunable Paramagnetic Relaxation Enhancements by $[\text{Gd}(\text{DPA})_3]^{3-}$ for Protein Structure Analysis, *J. Biomol. NMR*, 2010, **47**(2), 143–153, DOI: 10.1007/s10858-010-9416-x.
- 40 A. J. Pell, G. Pintacuda and C. P. Grey, Paramagnetic NMR in Solution and the Solid State, *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.*, 2019, **111**, 1–271, DOI: 10.1016/j.pnmrs.2018.05.001.

RESEARCH ARTICLE

View Article Online
View Journal | View Issue



Cite this: *Inorg. Chem. Front.*, 2021, 8, 947

Solid-state versus solution investigation of a luminescent chiral BINOL-derived bisphosphate single-molecule magnet†

Carlo Andrea Mattei,^a Vincent Montigaud,^a Frédéric Gendron,^a Sandrine Denis-Quanquin,^b Vincent Dorcet,^a Nicolas Giraud,^c François Riobé,^b Gilles Argouarch,^a Olivier Maury,^b Boris Le Guennic,^{a*} Olivier Cadot,^a Claudia Lalli^a and Fabrice Pointillart^{a*}

The enantiopure coordination polymer [Dy(hfac)₃((S/R)-L)]_n ((S/R)-1)_n involving a BINOL-derived bisphosphate ligand (S/R)-L is reported. Paramagnetic NMR and computational investigations demonstrated the formation of mononuclear species [(S/R)-1] in CH₂Cl₂ solution and its optimized structure was determined. The experimental electronic circular dichroism signals of (S/R)-L were strongly enhanced after metal coordination [(S/R)-1]. Both polymeric and mononuclear structures displayed field-induced Single-Molecule Magnet (SMM) behaviour with similar multi-relaxation processes due to the retention of crystal-field splitting determined by CASSCF calculations, despite the strong structural transformation between the two media. The HOMO → LUMO transition of the (S)-L ligand induced the classical Dy(III) emission at 77 K that was correlated with the magnetic properties. [(S)-1]_n is described as one-dimensional assembly of chiral luminescent Single-Ion Magnets (SIMs).

Received 30th September 2020,
Accepted 27th November 2020

DOI: 10.1039/d0qi01192d

rsc.li/frontiers-inorganic

Introduction

In recent decades, scientific communities have been investigating molecular materials because of their multiple physical properties especially when more than one is displayed in a unique system. Such a system is called a multifunctional or multiple-property molecular material.^{1–8} One of the most studied properties in molecular materials is probably chirality.^{9–12} In fact chiral molecular materials display specific physical and chemical properties such as multiferroic effects, asymmetric catalysis...opening up the field of applications.^{13–16} Moreover the combination of two properties such as chirality and magnetism, for example in chiral molecular magnets, can lead to the observation of a third property *i.e.* magneto-chiral anisotropy.^{17–27}

Since the discovery in 2003 of the Single-Molecule Magnet (SMM) behaviour for a mononuclear complex of Tb(III),²⁸ the molecular magnetism field has been dominated by the investigation of lanthanide-based SMMs.^{29–37} SMMs are nanomagnets presenting blocking reversal magnetization up to 80 K (ref. 38) attracting great interest for potential applications in high density data storage.^{39,40} At low temperature, SMMs are able to display quantum properties opening the doors to several other applications in molecular spintronics,^{41–45} quantum computing^{46–50} and magneto-optics.⁵¹

In addition, one of the advantages in using lanthanide ions is their specific luminescence which can be seen as a fingerprint of the ground level crystal-field splitting and thus can be correlated with magnetic properties.^{52–65} Combining the two properties, luminescence of lanthanides and chirality, multi-property SMMs were recently reported such as luminescent chiral SMMs,⁶⁶ ferroelectric SMMs,^{67–71} or magneto-chiral SMMs⁷² but examples remain scarce. In these examples, the chirality mainly arises from the ligands which play crucial roles in the sensitization of the emission properties and the optical activity. In order to optimize the latter properties, one strategy consists of using chiral ligands with an high optical activity and extended π -conjugated systems such as [n]-helicenes⁷³ and binaphthyl derivatives.⁷⁴ The former was used by some of us to produce chiral SMMs^{75–77} and singlet oxygen photosensitizers⁷⁸ while binaphthyl derivatives are well-known for enantioselective Diels-Alder reactions^{79–84} and were

^aUniv Rennes, CNRS, ISCR (Institut des Sciences Chimiques de Rennes) - UMR 6226, F-35000 Rennes, France. E-mail: fabrice.pointillart@univ-rennes1.fr, boris.leguennic@univ-rennes1.fr

^bUniv Lyon, ENS de Lyon, CNRS UMR 5182, Université Claude Bernard Lyon 1, Laboratoire de Chimie, F69342 Lyon, France

^cUniversité de Paris, Laboratoire de Chimie et Biochimie Pharmacologies et Toxicologies, UMR CNRS 8601, Paris, France

† Electronic supplementary information (ESI) available. CCDC 1980770. For ESI and crystallographic data in CIF or other electronic format see DOI: 10.1039/d0qi01192d

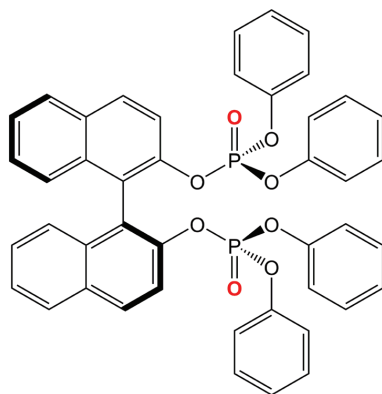


Chart 1 Molecular structure of the ligand (S)-L.

recently described for Circularly Polarized Luminescence (CPL).^{85–87}

In this article, enantiopure forms of the BINOL-derived bisphosphate (S/R)-L (Chart 1) were used to link Dy(hfac)₃ units (hfac[−] = 1,1,1,5,5,5-hexafluoroacetylacetonate) to form solid-state enantiopure coordination polymers of the formula [Dy(hfac)₃((S/R)-L)]_n, called here [(S/R)-1]_n, whereas a monomeric form [(S/R)-1] was formed in solution. Deep magnetic and optical investigations were carried out showing 1D assembly of luminescent field-induced-SMMs and Single-Ion Magnets (SIM) respectively in solid-state and solution. Coordination of the lanthanide units induced strong enhancement of the electronic circular dichroism contributions at low energy in solution.

Experimental

The precursors M(hfac)₃·2H₂O (hfac[−] = 1,1,1,5,5,5-hexafluoroacetylacetonate anion)⁸⁸ and the (S/R)-L ligand⁸⁹ were synthesized following previously reported methods. All the other reagents were purchased from Merck Co., Inc. and used without further purification.

Synthesis of the complex [M(hfac)₃((S/R)-L)]_n (M = Dy [(S/R)-1]_n, Eu [(S/R)-2]_n, and Y[(S)-3]_n)

0.04 mmol M(hfac)₃·2H₂O (32.8 mg for M = Dy, 29.8 mg for M = Y and 32.4 mg for M = Eu) were added into a solution of 30.0 mg of (S)-L or (R)-L (0.04 mmol) in 2 mL of CH₂Cl₂. After 15 minutes of stirring, 80 mL of hexane were layered. After several days, the solution was slowly evaporated leading to a colorless and microcrystalline solid. Yield 56.4 mg (92%) for [(S)-1]_n, 42.3 mg (69%) for [(S)-2]_n, 43.9 mg (72%) for [(S)-3]_n. Anal. Calcd (%) for C₅₉H₃₅DyF₁₈O₁₄P₂: C 46.15, H 2.28; found: C 46.09, H 2.39; C₅₉H₃₅EuF₁₈O₁₄P₂: C 46.46, H 2.30; found: C 46.09, H 2.40. C₅₉H₃₅YF₁₈O₁₄P₂: C 48.47, H 2.40; found: C 49.01, H 2.44. I.R. (KBr, range 3200–400 cm^{−1}): 3136 (w), 3080

(w), 3068 (w), 2964 (w), 1656 (s), 1627 (w), 1591 (m), 1558 (m), 1526 (m), 1501 (s), 1489 (s), 1456 (w), 1432 (w), 1363 (w), 1348 (w), 1254 (s), 1191 (s), 1143 (s), 1102 (m), 1079 (m), 1029 (s), 1015 (s), 1005 (m), 994 (m), 961 (m), 951 (m), 902 (w), 875 (w), 869 (w), 850 (w), 821 (m), 807 (m), 796 (m), 779 (m), 763 (m), 753 (m), 740 (w), 704 (w), 686 (m), 662 (m), 615 (w), 585 (m), 558 (w), 554 (w), 526(w), 517 (w), 502(w), 495 (w), 482 (w), 464 (w) and 457 (w) cm^{−1}. For [(R)-2]_n, slow evaporation from CH₂Cl₂/hexane led to single crystals which were suitable for X-ray studies.

Materials and methods

Single crystal X-ray structure analysis

A single crystal of [(R)-2]_n was mounted on a APEXIII D8 VENTURE Bruker-AXS diffractometer for data collection (MoK_α radiation source, λ = 0.71073 Å), from the Centre de Diffractométrie (CDIFX), Université de Rennes 1, France. The structure was solved by direct methods using the SHELXT program⁹⁰ and refined with a full matrix least-squares method on F² using the SHELXL-14/7 program.⁹¹ Crystallographic data are summarized in Table S1.† Complete crystal structure results as a CIF file (CCDC 1980770†) including bond lengths, angles, and atomic coordinates are deposited as the ESI.†

Physical measurements

The elemental analyses of the compounds were performed at the Centre Régional de Mesures Physiques de l'Ouest, Rennes. Absorption spectra were recorded on a JASCO V-650 spectrophotometer in diluted solution, using spectrophotometric grade solvents. Electronic circular dichroism (ECD) was measured on a Jasco J-815 Circular Dichroism Spectrometer (IFR140 facility – Biosit-Université de Rennes 1). Emission spectra were measured using a Horiba-Jobin-Yvon Fluorolog-3 fluorimeter. The steady-state luminescence was triggered using unpolarized light from a 450 W xenon continuous wave (CW) lamp and detected at an angle of 90° by using a Hamamatsu R928. For low temperature measurements, samples were placed in 4 mm quartz tubes and set into a quartz tube filled with liquid nitrogen. The magnetic susceptibility measurements were performed on solid polycrystalline samples immobilized in Teflon pellets to prevent any orientation of the crystallites with the magnetic field. The dc magnetic susceptibility measurements were performed with a Quantum Design MPMS-XL SQUID magnetometer between 2 and 300 K in an applied magnetic field of 0.02 T for temperatures of 2–20 K, 0.2 T for temperatures of 20–80 K and 1 T for temperatures of 80–300 K. The ac magnetic susceptibility measurements were performed on a Quantum Design MPMS-XL SQUID for frequencies between 1 and 1000 Hz and Quantum Design PPMS magnetometers for frequencies between 50 and 10 000 Hz. These measurements were all corrected for the diamagnetic contribution as calculated with Pascal's constants.

NMR experiments

^1H NMR spectra were acquired on a 400 MHz Bruker Avance III HD spectrometer equipped with a nitrogen-cooled Prodigy cryoprobe. The ligands and the complexes were solubilized in CDCl_3 . 3 mm diameter NMR tubes were used to avoid convection issues (Fig. S4 and S5†). All the chemical shifts are given in Table S5.† Diffusion experiments were performed with a diffusion time Δ of 50 ms. Sine shaped pulse field gradients were used with a length δ of 1.5 ms and the gradient intensity was linearly incremented from 0.96 to 45.18 G cm^{-1} over 30 experiments (Fig. S6†). The temperature was regulated at 298 K. Diffusion curves were fitted using the Dynamics Centre software implemented in Topspin (Bruker). T_1 measurements were performed using the inversion recovery sequence. 16 K to 128 K points were acquired for a spectral width of 14 to 200 ppm. The relaxation delay was set between 2 and 10 s. 8 or 10 experiments were performed with a delay t varying between 10 ms and 1 or 10 s depending on the paramagnetism of the sample. ^{31}P NMR data were acquired on a 300 MHz Bruker Avance III HD spectrometer equipped with a broadband BBFO probe. A pulse sequence with power-gated decoupling was used, with 128 scans, an acquisition time of 0.67 s and a relaxation delay of 2 s (Fig. S7†).

Computational details

DFT geometry optimizations and TD-DFT excitation energy calculations of the ligand (S)-L were carried out with the Gaussian 09 (revision A.02) package⁹² employing the PBE0 hybrid functional.^{93,94,103} All atoms were described with the SVP basis sets.⁹⁵ The first 50 mono-electronic excitations were calculated. In all steps, a modelling of bulk solvent effects (solvent = dichloromethane) was included through the Polarizable Continuum Model (PCM),⁹⁶ using a linear-response non-equilibrium approach for the TD-DFT step.^{97,98}

The solution structures [(S/R)-1] were obtained using DFT calculations with the Amsterdam Density Functional (ADF) software package.^{100–102} These calculations employed the hybrid functional PBE0^{93,94,103} (Perdew-Burke-Ernzerhof) containing 25% of exact exchange in combination with the triple- ζ STO all-electron basis set with two polarization functions for all atoms (TZ2P)¹⁰⁴ and included scalar relativistic effects via the Zeroth-Order Relativistic Approximation (ZORA).¹⁰⁵ Solvent effects were taken into account by using the Conductor-Like Screening Model (COSMO)¹⁰⁶ with a dielectric constant of 4.8 to model chloroform. To avoid convergence issues, the paramagnetic Dy(III) ion was replaced by a diamagnetic Lu(III) ion for these structural optimizations.

The isotropic ^1H NMR chemical shifts were calculated with the NMR¹⁰⁷ module as implemented in ADF and are given with respect to tetramethylsilane (TMS). In the case of the paramagnetic complex, the pseudo-contact shifts (δ^{PCS}) were calculated using the point-dipole approximation as follows:¹⁰⁸

$$\delta^{\text{PC}} = \frac{1}{12\pi r^3} \left[\Delta\chi_{\text{ax}} (3\cos^2\theta - 1) + \frac{3}{2} \Delta\chi_{\text{rh}} \sin^2\theta \cos 2\phi \right]$$

in which r is the vector connecting the Dy(III) ion and the probed nucleus, $\Delta\chi_{\text{ax}}$ and $\Delta\chi_{\text{rh}}$ represent the axial and rhombic magnetic susceptibility anisotropy determined from the wavefunction theory calculations (see below), and θ and ϕ are the polar angles defining the position of the probed nucleus with respect to the frame of the magnetic susceptibility tensor.

The wavefunction theory (WFT) calculations for the solid-state structures were realized on the model complex of [(R)-2]_n (Fig. 1). The atomic positions were extracted from the X-ray crystal structure of [(R)-2]_n and only one Dy(III) ion was taken into account ($n = 1$). The optimization of the hydrogen and fluorine positions, while other atomic positions were kept frozen, has been carried out on the Y(III) parent molecule by Density Functional Theory (DFT) as implemented in the Gaussian 09 (revision D.01) package⁹² using the PBE0 hybrid functional.^{94,103} The “Stuttgart/Dresden” basis sets and effective core potentials were used to describe the yttrium atom⁹⁹ while other atoms were described with the SVP basis sets.⁹⁵ The WFT calculations were carried out with the help of the OpenMolcas software package.¹⁰⁹ In these calculations, the complete active space self-consistent field¹¹⁰ (CASSCF) approach was used to treat the static correlation effects arising from the partially filled 4f shell of the Dy(III) ion. The second-order Douglas-Kroll-Hess^{111–114} scalar relativistic (SR) Hamiltonian was used to treat the scalar relativistic effects in combination with the all-electron atomic natural orbital relativistically contracted (ANO-RCC) basis set from the Molcas library.^{115–117} The basis sets were contracted to the triple- ζ plus polarization (TZP) quality for the Dy, P and O atoms bonded to the lanthanide (Dy = 25s22p15d11f4g2h/8s7p4d3f2g1h; P = 17s12p5d4f2g/5s4p2d1f; O = 14s9p5d3f2g/4s3p2d1f), and to the double- ζ quality for the rest of the O atoms and H, C and F atoms (H = 8s4p3d1f/2s; C = 14s9p5d3f2g/3s2p, and F = 14s9p5d3f2g/3s2p). The calculations employed the state-averaged formalism at the SR level by taking into account the 21 sextet, the 224 quartet and the 490 doublet spin states arising from the 9 electrons spanning the seven 4f orbitals (i.e. CAS(9,7)). The spin-orbit coupling (SOC) was then introduced within a state interaction on the basis of calculated SR states using the restricted active space state interaction (RASSI) approach.¹¹⁸ Herein the SOC matrix is diagonalized using the calculated 21 SR sextet, 224 SR quartet and the 98th lowest SR doublet spin states. The EPR g-factors were calculated according to ref. 119 as implemented in the

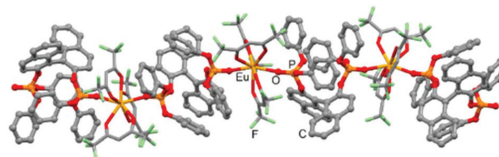


Fig. 1 Molecular structure of the one-dimensional polymer [Eu(hfac)₃((R)-L)]_n [(R)-2]_n. Hydrogen atoms are omitted for clarity.

RASSI module of OpenMolcas, whereas the magnetic susceptibility and magnetization calculations were performed using the Single-Aniso module of OpenMolcas as detailed in ref. 120. The dipole-dipole interaction¹¹⁷ between two magnetic centers 1 and 2, bearing the magnetic moment μ_1 and μ_2 respectively, is described as

$$H_{\text{dip}} = -\frac{1}{R_{12}^3} \mu_1 \cdot \mu_2 - 3(\mu_1 \cdot \vec{r}_{12})(\mu_2 \cdot \vec{r}_{12})$$

where R_{12} corresponds to the distance between the magnetic centers and $\vec{r}_{12}$ stands for the unit vector along the 12 direction.

Results and discussion

Structural description

[Eu(hfac)₃(*R*)-L)]_n [(*R*)-2]_n. It crystallizes in the chiral orthorhombic space group *C*222₁ (no. 20) (Table S1†) and its asymmetric unit is composed of one (*R*)-L ligand and one Eu(hfac)₃ moiety. The Eu(hfac)₃ moieties are linked by the (*R*)-L ligands acting as a bridge through the two P=O groups to form a one-dimensional structure (Fig. 1 and S1†). The Eu(III) ion is surrounded by eight oxygen atoms coming from three hfac[−] anions and two P=O groups coming from two different (*R*)-L ligands. The arrangement of the ligands around the central Eu(III) ion leads to a distorted square antiprism coordination polyhedron (*D*_{4d} symmetry, SAPR-8 = 0.300). The deviations from the ideal symmetries are determined by SHAPE¹²¹ analysis (Table S2†). The Eu–O_{hfac} bond lengths (2.395(9) Å) are found to be slightly longer than the Eu–O_{P=O} bond lengths (2.372(9) Å). The P=O–Eu–O_{P=O} angle is equal to 145.4(3)°. At this point, it could be important to note that one of the two L ligands presents two disordered positions with 74/26 occupancies. The average angle value between the planes formed by the naphthyl groups is 100.9(2)°. The crystal packing (Fig. S2†) highlights both π -CH interactions and F...H contacts to ensure the cohesion of the crystal but no π - π stacking has been found. The shortest intra-chain Eu–Eu distance is equal to 12.65(2) Å while the shortest inter-chain Eu–Eu distance is determined in the same range with a value of 11.47(2) Å.

[Dy(hfac)₃(*S*)-L)]_n [(*S*)-1]_n. No single crystals of satisfactory quality for X-ray diffraction studies could be obtained. Thus the phase purity for the Dy(III) analogue was checked by powder X-ray diffraction at room temperature. This study confirmed that the single crystal structure of [(*R*)-2]_n corresponds to the bulk material and its phase purity. Fig. S3† displays the excellent agreement between the experimental and simulated (from single crystal data) patterns allowing to conclude that [(*S*)-1]_n is pure and isomorphous to [(*R*)-2]_n.

NMR studies

The significant solubility of the [(*S*/*R*)-1]_n derivative in classical organic solvents prompted us to undertake a complete NMR study in order to definitively prove that the polymeric structure observed in the solid state was destroyed and replaced by

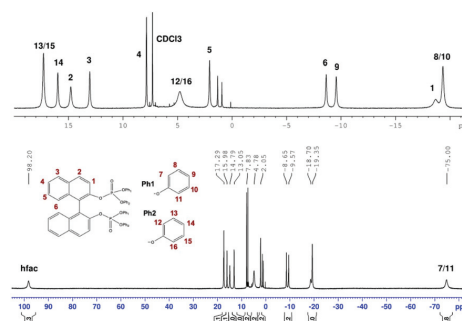


Fig. 2 (Bottom) Assigned ¹H NMR (400 MHz) spectrum of [(*S*)-1] in CDCl₃ at room temperature, with expansion of the central region (top).

smaller molecular weight oligomers or monomers as previously suggested but not fully demonstrated.⁸⁶ The ¹H NMR spectrum in CDCl₃ solution (Fig. 2) reveals a single set of 13 well resolved signals indicating that the solution structure retained a symmetry of the BINOL derivative (equivalence of naphthyl protons). The relaxation times (Table S3†) are found to be rather short, in the range of 1–80 ms, depending on the proximity of the proton to the strongly paramagnetic Dy(III) central ion. We have also evaluated the size of the molecular species in solution that resulted from the dissolution of the [(*S*/*R*)-1]_n derivatives, through the measurement of their diffusion coefficient. NMR experiments using pulsed gradient spin-echo (PGSE) are known as accurate tools to address this question. These methods have been recently successfully extended to paramagnetic species.¹²² However, we recently demonstrated that paramagnetic complexes inducing too fast relaxation processes (*T*₁ < 10 ms) do not allow nuclear spin polarization to survive over typical diffusion delays inherent to the PGSE method.¹²³ To tackle this drawback the dysprosium derivative was bracketed by europium [(*S*)-2]_n and yttrium [(*S*)-3]_n analogues featuring larger and smaller ionic radius, respectively. Their NMR spectra (Fig. S4 and S5†) indicate a similar behavior in solution and the relaxation times of the protons in the range of 1–2 s for the diamagnetic Y(III) derivative and of 0.14–1.6 s for the weakly paramagnetic Eu(III) are now fully compatible with diffusion experiments (Table S4†). The diffusion coefficients of the free ligand and the related Y(III) and Eu(III) complexes were measured (see the Experimental section for details) (Table 1) and allow us to estimate the size of the solution species thanks to eqn (1).^{124,125}

$$D = \frac{k_B T \left(\frac{3\alpha}{2} + \frac{1}{1+\alpha} \right)}{6\pi\eta \sqrt{\frac{3MW}{4\pi\rho_{\text{eff}}N_A}}} \quad \text{with } \alpha = \sqrt{\frac{MW_s}{MW}} \quad (1)$$

where MW_s and MW represent the molecular weight of the solvent and the solute, respectively, η is the viscosity of the solvent, and $k_B T$ is the thermal driving force at a temperature *T*. The main hypothesis of this formula concerns the ρ_{eff}

Table 1 Molecular weight (MW) and diffusion coefficients calculated according to eqn (1) (D_{calc}) for the ligand (S)-L and for a monomer or a dimer, and measured by NMR (D_{obs}) for the ligand (S)-L and for the Europium and Yttrium complexes [(S)-2] and [(S)-3] in solution in CDCl₃

	(S)-L	[(S)-Ln] _n					
		[(S)-1] Ln = Dy		[(S)-3] Ln = Y		[(S)-2] Ln = Eu	
		<i>n</i> = 1	<i>n</i> = 2	<i>n</i> = 1	<i>n</i> = 2	<i>n</i> = 1	<i>n</i> = 2
MW	751	1534	3068	1461	2922	1524	3048
D_{calc} (μm ² s ⁻¹)	753 ± 113	544 ± 82	405	557	414	547	406
D_{obs} (μm ² s ⁻¹)	760 ± 8	nd		673 ± 8		675 ± 8	

empirical parameter representing the effective density of an organic molecule, estimated to be 619 kg m⁻³.¹²⁵ In the case of the free organic ligand (S)-L, a diffusion coefficient $D_{\text{obs}} = 760 \mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$ was found in line with what is expected for a unique species with a molecular weight MW = 750 g mol⁻¹ leading to a calculated diffusion coefficient $D_{\text{calc}} = 753 \mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$ according to eqn (1) (Table 1). In the case of the complexes the experimental diffusion coefficient was measured as $D_{\text{obs}} = 675 \mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$ for [(S)-2] (Fig. S6†) and $D_{\text{obs}} = 673 \mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$ for [(S)-3]. As expected these values are lower than those of the free ligand because the molecular mass of the complexes is higher. However, these experimental diffusion coefficients are higher than that calculated using eqn (1) and the hypothesis of a monomer formation (Table 1). *A fortiori*, any larger oligomers (e.g. dimer in Table 1) will lead to even lower calculated diffusion coefficients and consequently the formation of a monomer in solution is the most probable scenario. Differences between the experimental and calculated diffusion coefficient values have already been described in the literature and can be ascribed to the empirical effective density parameter determined in the case of organic molecules.¹²² For coordination complexes containing heavy atoms especially in the case of lanthanide ions, the ρ_{eff} parameter in eqn (1) is expected to be largely underestimated, hence yielding an underestimated calculated diffusion coefficient as is the case here. In conclusion, this NMR solution analysis suggests that the polymeric structure observed in the solid state is no longer conserved in solution and that a monomeric complex of formula [M(hfac)₃(S)-L], denoted [(S)-1,2,3], is formed, where (S)-L acts as a bidentate ligand. The complete assignment of the [(S)-1] ¹H NMR spectrum was then undertaken (Fig. 2). As the 2D COSY correlation and relaxation time (T_1) measurements were not sufficient for a full assignment, we decided first to study the NMR spectra obtained by dissolution of the europium [(S)-2] and yttrium [(S)-3] analogues in CDCl₃, having, respectively, a lower paramagnetism and no paramagnetism. Complete attribution was easily obtained for [(S)-2,3] thanks to 2D COSY and ¹³C HSQC (Table S5†). These data were used as a starting point to assign [(S)-1] using a comparative method (eqn (2)) described by Di Bari and co-workers to interpret the value of the experimentally measured shifts δ_i^{Exp} :¹²⁶

$$\delta_i^{\text{Exp}}([\text{Dy}]) = \delta_i^{\text{dia}} + K \times \delta_i^{\text{PCS}}([\text{Eu}]) \quad (2)$$

where δ_i^{dia} is the diamagnetic contribution determined by the spectrum of [(S)-3] and $\delta_i^{\text{PCS}}([\text{Eu}])$ represents the pseudo-contact shift contribution determined in the case of [(S)-2]. The assignment of [(S)-1] was checked by plotting the pseudo-contact shift contribution of [(S)-1] versus that of [(S)-2] leading to the expected linear relationship (Fig. S8†). The complete assignments of [(S)-1,2,3] are given in Table S5.† Thus, in the ¹H NMR spectrum of [(S)-1] the resonance at $\delta = 98.2$ ppm can be unambiguously assigned to the three hfac⁻ protons and the 12 remaining signals correspond to the ligand featuring an average two-fold symmetry in solution (12 signals are observed for 24 protons).

Starting from the hypothesis that such a polymeric structure is transformed into a monomeric structure in solution,⁸⁶ DFT calculations were carried out in order to unravel the structure of such a monomer (see Computational details). The result of the optimized structure for the solution complex [(S)-1] is depicted on the top of Fig. 3. To confirm the closeness of the calculated structure with respect to the experimental one, proton chemical shifts (δ^{Calc}) of the yttrium analogue and paramagnetic pseudo-contact shifts (δ^{PCS}) in the Dy-based complex were calculated and compared to the experimental values (see Tables S6 and S7†). The calculated ¹H chemical shifts are found in good agreement with the experimental data for the diamagnetic Y(III) complex and confirm the presence of a 2-fold symmetry. In the paramagnetic Dy(III) complex, numerical agreement is not achieved with the experimental δ^{PCS} , which is strongly overestimated by the calculations and particularly for the phenyl groups of the ligand. However, the sign and relative magnitude between the shifts are reproduced when using the averaged values. For instance, the proton δ^{PCS} of the hfac⁻ ligands is calculated at +109 ppm, while experimental shifts are measured at +92 ppm. The large deviations arise from the static picture of the calculation versus the dynamic picture of the measurements in solution. Indeed, as is visible in Fig. S9,† the magnitude of the δ^{PCS} is strongly related to the magnetic anisotropy of the complex and the orientation of the molecule with respect to the magnetic axes. One can therefore conceive that the solution complex [(S)-1] exhibits free rotation of the phenyl groups, leading to averaged measured NMR values for these atoms.

Static magnetic properties

The experimental temperature dependence of χ_{MT} for [(S)-1]_n is presented in Fig. 4. At room temperature χ_{MT} is equal to

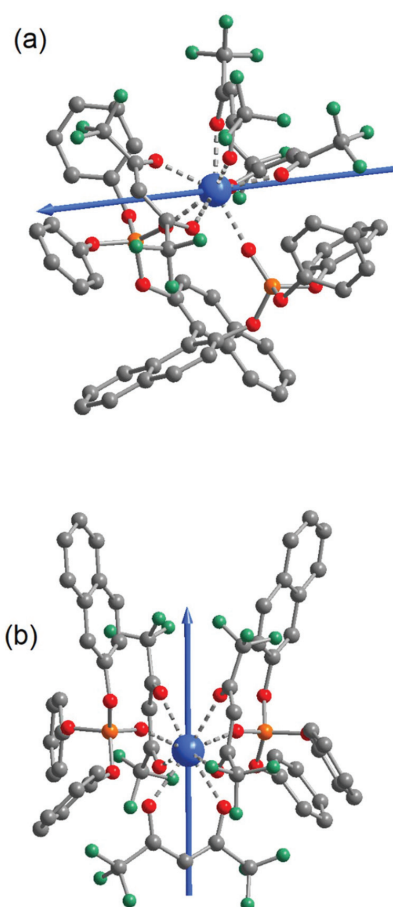


Fig. 3 (a) Optimized structure of $[(S)-1]_n$ ($n = 1$) expected in CH_2Cl_2 solution and (b) the model used for quantum calculations in solid-state. Orientations of the principal magnetic axis computed for $[(S)-1]$ (top) and $[(S)-1]_n$ (bottom) are represented.

$13.91 \text{ cm}^3 \text{ K mol}^{-1}$ which is in good agreement with $14.17 \text{ cm}^3 \text{ K mol}^{-1}$ expected for the ${}^6\text{H}_{15/2}$ ground multiplet.¹²⁷ On cooling down to 2 K, the thermal depopulation of the ligand field sublevels leads to a monotonic decrease of $\chi_M T$ which reaches $11.75 \text{ cm}^3 \text{ K mol}^{-1}$ at 4.5 K before showing a slight increase at the lowest temperatures. This increase below 4.5 K could be assigned to ferromagnetic dipolar interaction between the magnetic moment of the Dy(III) ions as already observed for other Dy(III) systems.⁷⁵ The field-dependence of magnetization measured at 2 K is depicted in the inset of Fig. 4. It showed classic behaviour for a Dy(III) ion in molecular systems. In fact, at 5 T, the value of the magnetization reaches $5.12N\beta$ which is far from the expected saturated values of $10N\beta$ for one Dy(III) in the absence of magnetic anisotropy but matches well with the stabilization of the $M_J = \pm 15/2$ Kramers

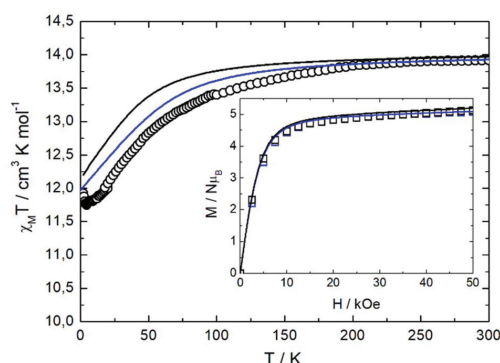


Fig. 4 Thermal dependence of $\chi_M T$ for $[(S)-1]_n$ (solid-state measurements) (black circles). Inset: field variation of the magnetization measured at 2 K for $[(S)-1]_n$ (solid-state measurements) (black squares) and $[(S)-1]$ (CH_2Cl_2 $C = 3 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ solution measurements) (blue squares). Black and blue lines correspond to the *ab initio* computational results obtained with the solid-state and solution model compounds, respectively (see text for details).

doublet ($5N\beta$). The inset of Fig. 4 depicted also the field-dependence of magnetization measured at 2 K for $[(S)-1]$ (frozen CH_2Cl_2 solution) with a similar behaviour to $[(S)-1]_n$.

Dynamic magnetic properties

The ac magnetic susceptibility for $[(S)-1]_n$ was measured using the same immobilized crushed single crystals as for dc measurements while such measurements for $[(S)-1]$ were performed using a 0.03 M frozen CH_2Cl_2 solution of $[(S)-1]_n$. The out-of-phase component, χ''_M , of the ac susceptibility passes through a maximum at 7000 Hz at 2 K in zero external dc field for $[(S)-1]_n$ (Fig. S10†). Such a maximum is shifted to higher frequencies with temperature and the relaxation time (τ) has been extracted with an extended Debye model (see ESI, Fig. S11, Table S8†). The thermal dependence of the magnetic relaxation time in a zero applied magnetic field was fitted taking into account the quantum tunnelling of the magnetization (QTM), and Raman processes ($\tau^{-1} = \tau_{\text{QTM}}^{-1} + C\text{T}^n$).¹²⁸ The best fits were obtained considering the following parameters: $C = 34.6(5) \text{ s}^{-1} \text{ K}^{-n}$ and $n = 4.23(79)$, $\tau_{\text{QTM}} = 2.01(10) \times 10^{-5} \text{ s}$ (Fig. S12†). The normalized Cole-Cole plot shows that the out-of-phase component of the magnetic susceptibility represents 75% of $[(S)-1]_n$ at zero magnetic field (Fig. S13†). The application of a constant magnetic field shifts the maximum of χ''_M to a lower frequency. Nevertheless, two contributions were observed as soon as the applied magnetic field value reached 500 Oe (Fig. 5 and S14†) and the value of 1000 Oe was selected (value at which the two relaxation contributions are both at the lowest frequency and without saturation effects). At 1000 Oe, both in-phase, χ'_M , and out-of-phase components of $[(S)-1]_n$ show a frequency and temperature dependence (Fig. 6 and S15†). The temperature dependence of the relaxation time of the magnetic susceptibility was extracted fitting simul-

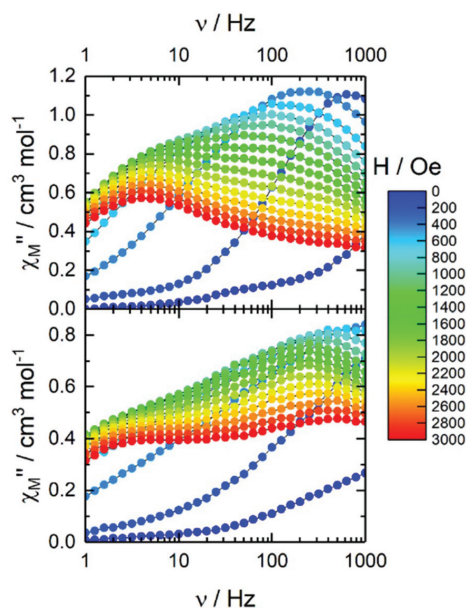


Fig. 5 Frequency dependence χ''_M at 2 K in the 0–3000 Oe field range for $[(S-1)]_n$ (top) and $[(S)-1]$ (frozen CH_2Cl_2 solution $C = 3 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$, bottom).

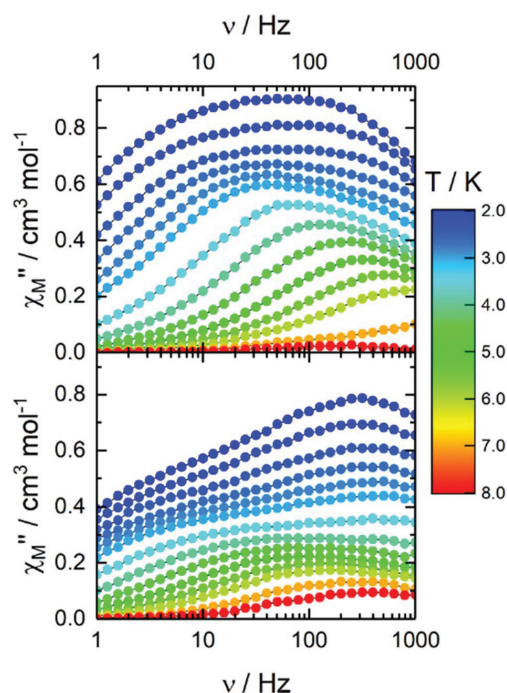


Fig. 6 Frequency dependence of χ''_M between 2 and 8 K for $[(S)-1]_n$ (above) and $[(S)-1]$ (frozen CH_2Cl_2 solution $C = 3 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$, below) under an applied magnetic field of 1000 Oe.

taneously χ'_M and χ''_M with an extended Debye model (Fig. S16†). For the 2–3.5 K temperature range, the two contributions were taken into account while for $T \geq 4$ K only one contribution was considered. The relaxation time of the magnetization (τ) for the low frequency (LF) contributions can be fitted using the thermally dependent Raman process ($\tau^{-1} = C\tau^n$) and Direct process ($\tau^{-1} = A\tau^m$ with m fixed to 4) while the high frequency (HF) contribution could be fitted by a Direct process only. The best fits were obtained considering the following parameters: $C = 0.12(9) \text{ s}^{-1} \text{ K}^{-n}$, $n = 6.10(48)$ and $A = 8.87(36) \times 10^{-12} \text{ Oe}^{-4} \text{ K}^{-1} \text{ s}^{-1}$ for the LF contribution; $A = 9.44(10) \times 10^{-10} \text{ Oe}^{-4} \text{ K}^{-1} \text{ s}^{-1}$ for the HF contribution (Fig. 7). For $H = 0$ Oe the main magnetic relaxation process is the QTM with significant Raman contribution for $T > 5.5$ K (Fig. S12†) while for $H = 1000$ Oe the main magnetic relaxation is the Raman with a Direct contribution for $T < 2.5$ K (Fig. S17†). The LF and HF contributions could be attributed to Dy(III) ions in different coordination environments^{129,130} or crystallographically independent Dy(III) ions¹³¹ but also to the presence of significant dipolar interaction.¹³² In the present case, the pure phase of $[(S)-1]_n$ involved only one Dy(III) centre and the frequency dependence of the magnetic susceptibility was investigated at a field high enough to cancel the dipolar interaction. Thus the presence of both LF and HF contributions might be attributed to (i) the structural disorder of one of the two coordinated ligands even if the second coordination sphere is affected^{133,134} and (ii) an intramolecular mechanism of mul-

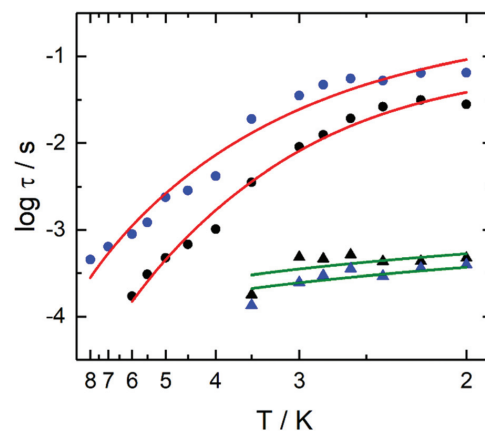


Fig. 7 Temperature dependences of the relaxation times (τ) at 1000 Oe for $[(S)-1]_n$ (in black) and in the temperature range of 2–6 K for the LF contribution (black dots) and 2–3.5 K for the HF contribution (black triangles) and for $[(S)-1]$ in the temperature range of 2–8 K for the LF contribution (blue dots) and 2–3.5 K for the HF contribution (blue triangles). Red and green lines are the best fitted curves with parameters given in the text.

multiple relaxation times at the single ion level because several relaxation modes might exist in the systems as demonstrated by L. F. Chibotaru and coll.¹³⁵

To support the hypothesis of an intramolecular origin for the observation of multi-contributions of the magnetic susceptibility frequency dependence, a magnetic study in frozen CH₂Cl₂ solution was performed. Earlier in this paper, both NMR studies and DFT calculations concluded the presence of monomeric species in CH₂Cl₂ solution and the dissolution of a compound in an organic solvent is a well-known method to perform magnetic dilution leading to the cancelling of supramolecular¹³⁶ and dipolar interactions.^{137,138} The scan field of the ac magnetic susceptibility for the isolated mononuclear species [(S)-1] in solution shows somehow a similar behaviour to [(S)-1]_n and thus a 1000 Oe value was selected (Fig. 5 and S14†) to study the ac magnetic properties of [(S)-1]. The frequency dependence of χ''_M clearly shows two contributions (Fig. 6 and S15†). The temperature dependence of the relaxation time was extracted using the same method as that for [(S)-1]_n (Fig. S18†). For the 2–3.5 K temperature range, the two contributions were taken into account while for $T \geq 4$ K only one contribution was considered. The relaxation time of the magnetization (τ) for the low frequency (LF) contributions can be fitted using the thermally dependent Raman process ($\tau^{-1} = CT^n$) and Direct process ($\tau^{-1} = ATH^m$ with m fixed to 4) while the high frequency (HF) contribution could be fitted by a Direct process only. The best fits were obtained considering the following parameters: $C = 0.15(15) \text{ s}^{-1} \text{ K}^{-n}$, $n = 4.82(55)$ and $A = 3.26(24) \times 10^{-12} \text{ Oe}^{-4} \text{ K}^{-1} \text{ s}^{-1}$ for the LF contribution; $A = 1.35(11) \times 10^{-9} \text{ Oe}^{-4} \text{ K}^{-1} \text{ s}^{-1}$ for the HF contribution (Fig. 7). The relaxation of the magnetization occurs through a Raman process with a Direct contribution for $T < 2.5$ K (Fig. S19†). The observation of two different magnetic relaxations for [(S)-1] could not be attributed to different chemical magnetic centres or to significant intermolecular dipolar interactions¹³² since only one type of mononuclear complex was found by the NMR study and the solution ac measurements prevent the strong interaction between the complexes. The absence of significant interaction between the molecules at $C = 3 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ was verified repeating the magnetic measurements at $C = 3 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ without any change. At this stage, such magnetic behaviour in frozen solution might be attributed to an intramolecular origin even in single-ion metal complexes as proposed for [(S)-1]_n.¹³⁵

For the two compounds [(S)-1]_n and [(S)-1], the magnetization relaxed through Raman/Direct processes for the LF contribution and Direct process for the HF contribution. The difference might be imputed to the reorganization of the ligand around the metal centre and the matrix nature.

Ab initio calculations

The experimental magnetic properties of both [(S)-1]_n and [(S)-1] were rationalized with the help of WFT calculations. The experimental thermal dependence $\chi_M T$ product and field dependence of the magnetization for [(S)-1]_n were well repro-

duced by the calculations (see Fig. 4). Interestingly, calculations performed on the model structure for the solution complex [(S)-1] revealed similar $\chi_M T$ products and magnetizations. As visible in Table S11,† these similarities could arise from the presence of an analogous ground state (GS) in both cases, characterized by an almost pure $M_J = \pm 15/2$ (98% and 97% for [(S)-1]_n and [(S)-1] respectively), and by the combination of the energy splitting with the composition of the excited states (ES) (Table S9†). The experimental energy barrier values could be evaluated from the high temperature part of the $\log(\tau)$ vs. T curve (Fig. 7). The calculated gaps (30 cm⁻¹ for [(S)-1]_n and 103 cm⁻¹ for [(S)-1]) are higher than the experimental ones (16 cm⁻¹ for [(S)-1]_n and 13 cm⁻¹ for [(S)-1]). The discrepancy between computed and experimental values could be due to efficient under energy barrier relaxation processes such as Raman and Direct processes (Fig. S20†). The two dysprosium centers present an almost uniaxial magnetic anisotropy ($g_z = 19.70$ and 19.57 for [(S)-1]_n and [(S)-1], respectively). The main magnetic anisotropy axis appears perpendicular to the P=O–Dy–O=P direction and along the hfac⁻ anion for [(S)-1]_n, while it was found perpendicular to the plane containing the two P=O groups for [(S)-1] *i.e.* for both cases along the most charged orientation of the oblate Dy(III) ion coordination sphere (Fig. 3). The structural disorder located on the bridging phosphate moieties was then studied by considering the configuration with the lowest occupancy coefficients, [(S)-1]_n (Fig. S21†). In this configuration, the derived phosphate ligand and the close CF₃ groups are tilted. However, the small impact of the reorientation of the ligand upon the first coordination sphere geometry leads to almost no difference between [(S)-1]_n and [(S)-1] in terms of ground state properties and crystal field splitting of the ⁶H_{15/2} multiplet of the Dy(III) ion (Fig. S22 and Table S11†). Consequently the two thermal dependences of the magnetic susceptibility are superimposed (Fig. S23†). Moreover an evaluation of the dipolar interactions was performed assuming an Ising-type anisotropy (only the g_{zz} was considered). The results of such calculations have shown that the main dipolar interactions are of ferromagnetic nature along the *a* and *c* axes and of weaker antiferromagnetic nature along the *b* axis (Fig. S24†). The average dipolar interactions are thus of ferromagnetic nature ($zJ' = 0.04 \text{ cm}^{-1}$) in agreement with the increase of the $\chi_M T(T)$ curve observed at low temperature (Fig. 4). Therefore, the origin of the two relaxation contributions observed in the solid-state cannot be attributed to the disorder of the ligands and might be attributed to intramolecular mechanisms. These computational results as well as the ac measurements highlighted that the non-significant *trans versus cis* position of the P=O anchoring groups might be due to the weaker participation of the oxygen atoms of the P=O than those of the hfac⁻ anions to the crystal field and to the nature of the ground state.¹³⁹ The difference of Ln–O bond lengths and the charge on the first neighboring atoms have an antagonist effect on the magnetic properties. Nevertheless, even if the Ln–O_{P=O} distances are shorter than the Ln–O_{hfac} bond lengths, the negatively charged character of the hfac⁻ benefits from the difference of bond lengths.

Photo-physical properties

Absorption and electronic circular dichroism (ECD). The UV-visible absorption properties of (S)-L, (R)-L, [(S)-1] and [(R)-1] were studied in a CH₂Cl₂ solution (Fig. 8). Rationalization by TD-DFT calculations was performed. The experimental absorption spectra for both enantiopure free ligands are superimposed and they can be decomposed in four contributions localized at 31 000, 34 500, 38 200 and 43 000 cm⁻¹ and respectively calculated at 32 804, 36 001, 41 387 and 45 568 cm⁻¹ (Table S12†). The lowest-energy excitation was attributed to the HOMO → LUMO transition; the two intermediate excitations were attributed to transitions involving mainly the HOMO and HOMO-1 to the LUMO, LUMO+1, LUMO+2 and LUMO+4. Finally the highest-energy excitation was attributed to π-π* transitions of the binaphthyl moieties (HOMO-1 → LUMO+6/+7). The experimental absorption spectra for complexes are similar to those for free ligands except that an additional intense excitation appeared at 33 000 cm⁻¹ due to the π-π* transitions of the hfac⁻ anions.¹⁴⁰ CH₂Cl₂ solution-state circular dichroism measurements performed at room temperature for (S)-L and (R)-L confirmed their enantiomeric nature (Fig. 8). The Cotton effect is very

weak in the low-energy range while it is strong in a high-energy range and dichroic contributions of opposite signs were observed at 38 500 cm⁻¹ and 42 700 cm⁻¹ for each enantiomer on the mirror-symmetrical dichroism spectra (Fig. 8). Such contributions come from the excitonic coupling between the π-π* transitions of the naphthyl groups.^{141–143} The ECD spectra for complexes highlighted a significant enhancement of the low-energy contributions centered at 30 200 cm⁻¹ and 33 600 cm⁻¹ while those at higher energy did not change. These observations might be due to the structural change induced by the coordination of the Dy(hfac)₃ unit, especially to the modification of the torsion angle of the binaphthyl group which mainly affects the low energy transitions. Indeed it was previously demonstrated that the optical activity of the binaphthyl-based ligands depends on the angle between the two planes formed by the naphthyl moieties.^{144–147} The structural changes after the coordination reaction are supported by the optical activity values (*c* 1.0, CHCl₃) for (S)-L ([α]_D²⁵ = +1.2° cm² dmol⁻¹) and (R)-L ([α]_D²⁵ = -1.0° cm² dmol⁻¹) which have been determined to be lower than those for [(S)-1] and [(R)-1] ([α]_D²⁵ = ± 25.8° cm² dmol⁻¹).

Luminescence. Emission properties were first checked in both solution [(S)-2] and solid-state [(S)-2]_n for the S enantiomer of the Europium analogue at room temperature (Fig. S23†). The excitation of the samples at 28 570 cm⁻¹ (350 nm) induced the characteristic Eu(III) ion-centered luminescence profile with five ⁵D₀ → ⁷F_{*J*} (*J* = 0–4) and four (*J* = 1–4) transitions respectively in solution and solid. The single Gaussian shape of the ⁵D₀ → ⁷F_{*J*} transition in solution is an additional indication of the presence of one species in CH₂Cl₂ solution. In the case of europium, the splitting of each ⁵D₀ → ⁷F_{*J*} transition is correlated with the crystal field and is, therefore, representative of the local symmetry. The splitting of the ⁵D₀ → ⁷F₂ transition into three is in agreement with the *D*_{4d} local symmetry of the europium coordination sphere.¹⁴⁸ Emission properties of the S enantiomer of the dysprosium complex were also studied in solution on [(S)-1] and solid-state on [(S)-1]_n at room temperature (Fig. S24†) and low temperature. The excitation of the samples at 28 570 cm⁻¹ (350 nm) induced the characteristic Dy(III) ion-centered luminescence assigned to the ⁴F_{9/2} → ⁶H_{*J*} emission (*J* ranging from 9/2 to 15/2) (Fig. S26†). The emission spectrum of [(S)-1]_n is more resolved than the one for [(S)-1] as commonly observed for molecular complexes. Looking at the magnetic properties, a zoom of the transition involving the ⁶H_{15/2} ground state is shown in the inset of Fig. S25.† The total ⁴F_{9/2} → ⁶H_{15/2} emission range for [(S)-1] and [(S)-1]_n is very similar in agreement with the calculated energy splitting of the multiplet ground state (see the *ab initio* calculations section). The difference could be attributed to the reorganization of the S-L and hfac⁻ ligands in solution.^{149,150} It is now well known that the highest-energy emission can be described with a photograph of the ground state energy splitting which is at the origin of the magnetic properties of the single ion.^{56,61,65} Thus the following discussion is focused on the solid-state measurements in order to have the best resolved spectra as possible. The top

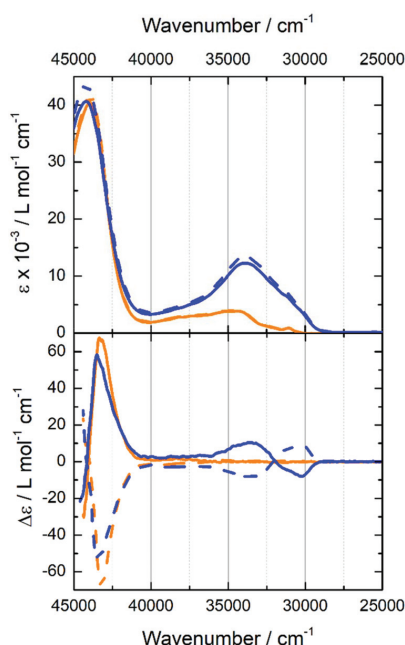


Fig. 8 (Top) Experimental UV-visible absorption spectra of (S)-L (orange line), (R)-L (dashed orange line), [(S)-1] (blue line) and [(R)-1] (dashed blue line) in CH₂Cl₂ solution (*C* = 5 × 10⁻⁵ mol L⁻¹). (Bottom) Experimental ECD spectra of enantiopure (S)-L (orange line) and (R)-L (dashed orange line) (CH₂Cl₂, ca. 5 × 10⁻⁵ M) and respective Dy(III) complexes [(S)-1] (blue line) and [(R)-1] (dashed blue line) (CH₂Cl₂, ca. 5 × 10⁻⁵ M).

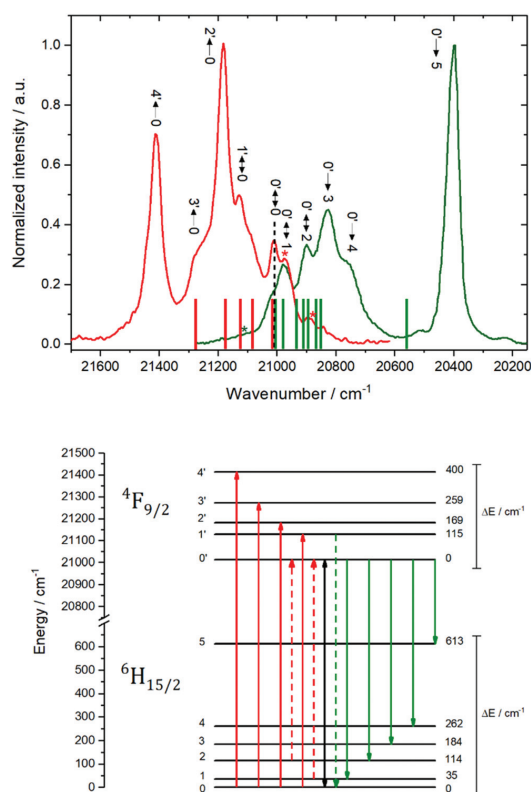


Fig. 9 (Top) Excitation spectrum (red line) and emission spectra (green line) at 77 K of $[(S)-1]_n$ with the calculated energy splitting for the $^4F_{9/2}$ (vertical red sticks) and $^6H_{15/2}$ (vertical green sticks) levels for an irradiation energy of $28\,570\text{ cm}^{-1}$. “Zero-phonon” transition is represented as a black dashed line while the hot bands are indicated by stars. (Bottom) Experimental energy diagram with related transitions. “Hot bands” are depicted in dashed lines.

of Fig. 9 depicts the excitation (red line) and emission spectrum at 77 K (green line) of $[(S)-1]_n$. A simple Boltzmann population calculation starting from the experimental excitation spectrum supported the fact that at 77 K some of the excited states of the $^7F_{9/2}$ and $^6H_{15/2}$ levels are populated (Fig. S26†) supporting the observation of “hot bands” for both excitation and emission spectra (Fig. 9). The calculation at the CASSCF level gave the energy splitting for the $^6H_{15/2}$ ground multiplet (green sticks in Fig. 9) and the $^4F_{9/2}$ excited multiplet (red sticks in Fig. 9). The experimental splitting of the $^6H_{15/2}$ ground multiplet appears strongly underestimated by the calculations. The energy gap between the ground and first excited states of the $^6H_{15/2}$ crystal field splitting is 40 cm^{-1} which is in agreement with the energy barrier determined from the *ab initio* calculations (30 cm^{-1}) (Table S11†). The value of 40 cm^{-1} is confirmed by the overlay with the excitation spec-

trum (“zero-phonon” transition) and the energy difference with the corresponding hot band (Fig. 9).

Conclusions

Two pure enantiomers of dysprosium BINOL-derived bisphosphate $[Dy(hfac)_3(S/R-L)]_n$ ($[(S/R)-1]_n$) with polymeric structures are reported. The combination of both NMR and computational investigations concluded the structural reorganization from a polymeric to a mononuclear $[(S)-1]$ structure once $[(S)-1]_n$ is in CH_2Cl_2 solution. Both species highlighted single-molecule magnet behavior under a 1000 Oe applied field through two Raman and Direct thermally dependent magnetic relaxation processes. The combination of the persistence of the multi-relaxation mechanism for the mononuclear species in solution and the computational results are strong indications of its intramolecular origin. The drastic structural modification between the solid-state and solution induced only small magnetic changes because the crystal field kept the Ising character of the $Dy(III)$ centre in both structures as confirmed by *ab initio* calculations. The EDC of $[(S)-1]$ highlighted an enhancement of the optical activity in the low energy range after coordination of the $Dy(hfac)_3$ unit, due to the sensibility of the corresponding excitations of the binaphthyl torsion angle. Both $[(S)-1]_n$ and $[(S)-1]$ displayed dysprosium-centered emission under irradiation of the HOMO $\rightarrow$ LUMO excitation of the BINOL derived bisphosphate organic chromophore. The luminescence data at 77 K for $[(S)-1]_n$ could be correlated with the experimental and calculated magnetic data. The present chiral luminescent single-molecule magnet opens the way to a rational investigation of the nature of the chiral ligand on the combined magnetic and optical properties such as single-molecule magnets and circularly polarized luminescence.

Conflicts of interest

There are no conflicts to declare.

Acknowledgements

This work was supported by CNRS, Université de Rennes and the European Research Council through the ERC-CoG 725184 MULTIPROSM (project no. 725184). B. L. G., F. G. and V. M. thank the French GENCI/IDRIS-CINES center for high-performance computing resources. F. G. acknowledges Région Bretagne for a Stratégie d'Attractivité Durable Grant (SA18006-LnCPLSMM). Part of this work has been performed using the Spectroscopies-DCTP core facility (UMS Biosit, Université de Rennes 1- Campus de Villejean- 35043 RENNES Cedex, FRANCE).

Notes and references

- 1 E. Coronado, A. Forment-Aliaga, J. R. Galán-Mascarós, C. Giménez-Saiz, C. J. Gómez-García, E. Martín-Ferrero, A. Nuez and F. M. Romero, Multifunctional molecular materials, *Solid State Sci.*, 2003, **5**, 917–924.
- 2 E. Coronado, C. Giménez-Saiz and C. Martí-Gastaldo, Crystal engineering of multifunctional molecular materials, in *Engineering of Crystalline Materials Properties, in NATO Science for Peace and Security Series B: Physics and Biophysics*, ed. J. J. Novoa and D. Braga and L. Addadi, Dordrecht, Springer, 2008, 173–191.
- 3 E. Coronado, F. Palacio and J. Veciana, Molecule-Based Magnetic Materials, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2003, **42**, 2570–2572.
- 4 P. Gómez-Romero and C. Sánchez, *Functional Hybrid Materials*, Wiley-VCH, Weinheim, 2004.
- 5 A. Fahmi, T. Pietsch, C. Mendoza and N. Cheval, Functional hybrid materials, *Mater. Today*, 2009, **12**, 44–50.
- 6 J. Rocha, L. D. Carlos, F. A. A. Paz and D. Ananias, Luminescent progress in hybrid materials science, *Chem. Soc. Rev.*, 2011, **40**, 926–940.
- 7 C. Sanchez, K. J. Shea and S. Kitagawa, Recent progress in hybrid materials science, *Chem. Soc. Rev.*, 2011, **40**, 471–472.
- 8 L. Ouahab, *Multifunctional Molecular Materials*, Taylor and Francis Group CRC Press, New York, NY, 2012.
- 9 R. A. Garoff, E. A. Litzinger, R. E. Connor, I. Fishman and B. A. Armitage, Helical Aggregation of Cyanine Dyes on DNA Templates: Effect of Dye Structure on Formation of Homo- and Heteroaggregates, *Langmuir*, 2002, **18**, 6330–6337.
- 10 M. Wang, G. L. Silva and B. A. Armitage, DNA-Templated Formation of a Helical Cyanine Dye J-Aggregate, *J. Am. Chem. Soc.*, 2000, **122**, 9977–9986.
- 11 R. F. Pasternack, A. Giannetto, P. Pagano and E. J. Gibbs, Self-assembly of porphyrins on nucleic acids and polypeptides, *J. Am. Chem. Soc.*, 1991, **113**, 7799–7780.
- 12 K. C. Hannah and B. A. Armitage, DNA-Templated Assembly of Helical Cyanine Dye Aggregates: A Supramolecular Chain Polymerization, *Acc. Chem. Res.*, 2004, **37**, 845–853.
- 13 Q.-H. Xia, H.-Q. Ge, C.-P. Ye, Z.-M. Liu and K.-X. Su, Advances in Homogeneous and Heterogeneous Catalytic Asymmetric Epoxidation, *Chem. Rev.*, 2005, **105**, 1603–1662.
- 14 W. Eerenstein, N. D. Mathur and J. F. Scott, Multiferroic and magnetoelectric materials, *Nature*, 2006, **442**, 759–765.
- 15 J. Chin, S. S. Lee, K. J. Lee, S. Park and D. H. Kim, A metal complex that binds α -amino acids with high and predictable stereospecificity, *Nature*, 1999, **401**, 254–257.
- 16 G. L. J. A. Rikken and E. Raupach, Enantioselective magnetochiral photochemistry, *Nature*, 2000, **405**, 932–935.
- 17 M. P. Groenewege, A theory of magneto-optical rotation in diamagnetic molecules of low symmetry, *Mol. Phys.*, 1962, **5**, 541–563.
- 18 G. Wagnière and A. Meier, The influence of a static magnetic field on the absorption coefficient of a chiral molecule, *Chem. Phys. Lett.*, 1982, **93**, 78–81.
- 19 L. D. Barron and J. Vrbancich, Magneto-chiral birefringence and dichroism, *Mol. Phys.*, 1984, **51**, 715–730.
- 20 G. L. J. A. Rikken and E. Raupach, Observation of magneto-chiral dichroism, *Nature*, 1997, **390**, 493–494.
- 21 L. D. Barron, Chirality, magnetism and light, *Nature*, 2000, **405**, 895–896.
- 22 C. Train, R. Gheorghe, V. Krstic, L. Chamoreau, N. S. Ovnesyan, G. L. J. A. Rikken, M. Gruselle and M. Verdaguer, Strong magneto-chiral dichroism in enantiopure chiral ferromagnets, *Nat. Mater.*, 2008, **7**, 729–734.
- 23 G. L. J. A. Rikken and E. Raupach, Pure and cascaded magnetochiral anisotropy in optical absorption, *Phys. Rev. E: Stat. Phys., Plasmas, Fluids, Relat. Interdiscip. Top.*, 1998, **58**, 5081–5084.
- 24 C. Koerdts, G. Duchs and G. L. J. A. Rikken, Magnetochiral Anisotropy in Bragg Scattering, *Phys. Rev. Lett.*, 2003, **91**, 073902.
- 25 Y. Kitagawa, H. Segawa and K. Ishii, Magneto-Chiral Dichroism of Organic Compounds, *Angew. Chem.*, 2011, **123**, 9299–9302.
- 26 Y. Kitagawa, T. Miyatake and K. Ishii, Evidence for atomic mixing via multiple intermediates during the dynamic interconversion of silicate oligomers in solution, *Chem. Commun.*, 2012, **48**, 5091–5093.
- 27 S. Bordács, I. Kézsmárki, D. Szaller, L. Demkó, N. Kida, H. Murakawa and Y. Onose, Chirality of matter shows up via spin excitations, *Nat. Phys.*, 2012, **8**, 734–738.
- 28 N. Ishikawa, M. Sugita, T. Ishikawa, S. Y. Koshihara and Y. Kaizu, Lanthanide Double-Decker Complexes Functioning as Magnets at the Single-Molecular Level, *J. Am. Chem. Soc.*, 2003, **125**, 8694–8695.
- 29 R. Sessoli and A. K. Powell, Strategies towards single molecule magnets based on lanthanide ions, *Coord. Chem. Rev.*, 2009, **253**, 2328–2341.
- 30 F. Habib and M. Murugesu, Lessons learned from dinuclear lanthanide nano-magnets, *Chem. Soc. Rev.*, 2013, **42**, 3278–3288.
- 31 D. N. Woodruff, R. E. P. Winpenny and R. A. Layfield, Lanthanide Single-Molecule Magnets, *Chem. Rev.*, 2013, **113**, 5110–5148.
- 32 R. A. Layfield and M. Murugesu, *Lanthanides and Actinides in Molecular Magnetism*, Wiley-VCH, Weinheim, 2015.
- 33 S. T. Liddle and J. van Slageren, Improving f-element single molecule magnets, *Chem. Soc. Rev.*, 2015, **44**, 6655–6669.
- 34 J. Tang and P. Zhang, *Lanthanide Single Molecule Magnets*, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, 2015.
- 35 K. L. M. Harriman and M. Murugesu, An Organolanthanide Building Block Approach to Single-Molecule Magnets, *Acc. Chem. Res.*, 2016, **49**, 1158–1167.

- 36 F. Pointillart, O. Cador, B. Le Guennic and L. Ouahab, Uncommon lanthanide ions in purely 4f Single Molecule Magnets, *Coord. Chem. Rev.*, 2017, **346**, 150–175.
- 37 F.-S. Guo, A. K. Bar and R. A. Layfield, Main Group Chemistry at the Interface with Molecular Magnetism, *Chem. Rev.*, 2019, **119**(14), 8479–8505.
- 38 F.-S. Guo, B.-M. Day, Y.-C. Chen, M.-L. Tong, A. Mansikkamäki and R. A. Layfield, Magnetic hysteresis up to 80 kelvin in a dysprosium metallocene single-molecule magnet, *Science*, 2018, **362**, 1400–1403.
- 39 M. Mannini, F. Pineider, P. Saintavirt, C. Danieli, E. Otero, C. Sciancalepore, A. M. Talarico, M.-A. Arrio, A. Cornia, D. Gatteschi and R. Sessoli, Magnetic memory of a single-molecule quantum magnet wired to a gold surface, *Nat. Mater.*, 2009, **8**, 194–197.
- 40 M. Affronte, Molecular nanomagnets for information technologies, *J. Mater. Chem.*, 2009, **19**, 1731–1737.
- 41 K. S. Pedersen, A.-M. Ariciu, S. McAdams, H. Weihe, J. Bendix, F. Tuna and S. Piligkos, Toward Molecular 4f Single-Ion Magnet Qubits, *J. Am. Chem. Soc.*, 2016, **138**, 5801–5804.
- 42 L. Bogani and W. Wernsdorfer, Molecular spintronics using single-molecule magnets, *Nat. Mater.*, 2008, **7**, 179–186.
- 43 R. Vincent, S. Klyatskaya, M. Ruben, W. Wernsdorfer and F. Balestro, Electronic read-out of a single nuclear spin using a molecular spin transistor, *Nature*, 2012, **488**, 357–360.
- 44 M. Ganzhorn, S. Klyatskaya, M. Ruben and W. Wernsdorfer, Strong spin–phonon coupling between a single-molecule magnet and a carbon nanotube nanoelectromechanical system, *Nat. Nanotechnol.*, 2013, **8**, 165–169.
- 45 A. Cornia and P. Seneor, The molecular way, *Nat. Mater.*, 2017, **16**, 505–506.
- 46 S. Thiele, F. Balestro, R. Ballou, S. Klyatskaya, M. Ruben and W. Wernsdorfer, Electrically driven nuclear spin resonance in single-molecule magnets, *Science*, 2014, **344**, 1135–1138.
- 47 M. N. Leuenberger and D. Loss, Quantum computing in molecular magnets, *Nature*, 2001, **410**, 789–793.
- 48 A. Ardavan, O. Rival, J. J. L. Morton, S. J. Blundell, A. M. Tyryshkin, G. A. Timco and R. E. P. Winpenny, Will Spin-Relaxation Times in Molecular Magnets Permit Quantum Information Processing?, *Phys. Rev. Lett.*, 2007, **98**, 057201.
- 49 P. C. E. Stamp and A. Gaita-Ariño, Spin-based quantum computers made by chemistry: hows and whys, *J. Mater. Chem.*, 2009, **19**, 1718–1730.
- 50 M. J. Martínez-Pérez, S. Cardona-Serra, C. Schlegel, F. Moro, P. J. Alonso, H. Prima-García, J. M. Clemente-Juan, M. Evangelisti, A. Gaita-Arino, J. Sesé, J. Van Slagaren, E. Coronado and F. Luis, Gd-Based Single-Ion Magnets with Tunable Magnetic Anisotropy: Molecular Design of Spin Qubits, *Phys. Rev. Lett.*, 2012, **108**, 247213.
- 51 R. Sessoli, M.-E. Boulon, A. Caneschi, M. Mannini, L. Poggini, F. Wilhelm and A. Rogalev, Strong magneto-chiral dichroism in a paramagnetic molecular helix observed by hard X-rays, *Nat. Phys.*, 2015, **11**, 69–74.
- 52 M.-E. Boulon, G. Cucinotta, J. Luzon, C. Degl'Innocenti, M. Perfetti, K. Bernot, G. Calvez, A. Caneschi and R. Sessoli, Magnetic Anisotropy and Spin-Parity Effect Along the Series of Lanthanide Complexes with DOTA, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2013, **52**, 350–354.
- 53 G. Cucinotta, M. Perfetti, J. Luzon, M. Etienne, P. E. Car, A. Caneschi, G. Calvez, K. Bernot and R. Sessoli, Magnetic Anisotropy in a Dysprosium/DOTA Single-Molecule Magnet: Beyond Simple Magneto-Structural Correlations, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2012, **51**, 1606–1610.
- 54 J. Long, R. Vallat, R. A. S. Ferreira, L. D. Carlos, F. A. Almeida Paz, Y. Guari and J. Larionova, A bifunctional luminescent single-ion magnet: towards correlation between luminescence studies and magnetic slow relaxation processes, *Chem. Commun.*, 2012, **48**, 9974–9976.
- 55 M. Ren, S.-S. Bao, R. A. S. Ferreira, L.-M. Zheng and L. D. Carlos, A layered erbium phosphonate in pseudo-D5 h symmetry exhibiting field-tunable magnetic relaxation and optical correlation, *Chem. Commun.*, 2014, **50**, 7621–7624.
- 56 F. Pointillart, B. Le Guennic, T. Cauchy, S. Golhen, O. Cador, O. Maury and L. Ouahab, A Series of Tetrathiafulvalene-Based Lanthanide Complexes Displaying Either Single Molecule Magnet or Luminescence-Direct Magnetic and Photo-Physical Correlations in the Ytterbium Analogue, *Inorg. Chem.*, 2013, **52**, 5978–5990.
- 57 F. Pointillart, B. Le Guennic, S. Golhen, O. Cador, O. Maury and L. Ouahab, A redox-active luminescent ytterbium based single molecule magnet, *Chem. Commun.*, 2013, **49**, 615–617.
- 58 F. Pointillart, B. Le Guennic, O. Cador, O. Maury and L. Ouahab, Lanthanide Ion and Tetrathiafulvalene-Based Ligand as a “Magic” Couple toward Luminescence, Single Molecule Magnets, and Magnetostructural Correlations, *Acc. Chem. Res.*, 2015, **48**, 2834–2842.
- 59 M. Ren, S.-S. Bao, B.-W. Wang, R. A. S. Ferreira, L.-M. Zheng and L. D. Carlos, Lanthanide phosphonates with pseudo-D5 h local symmetry exhibiting magnetic and luminescence bifunctional properties, *Inorg. Chem. Front.*, 2015, **2**, 558–566.
- 60 J. Long, E. Mamontova, V. Freitas, D. Luneau, V. Vieru, L. F. Chibotaru, R. A. S. Ferreira, G. Félix, Y. Guari, L. D. Carlos and J. Larionova, Study of the influence of magnetic dilution over relaxation processes in a Zn/Dy single-ion magnet by correlation between luminescence and magnetism, *RSC Adv.*, 2016, **6**, 108810–108818.
- 61 K. Soussi, J. Jung, F. Pointillart, B. Le Guennic, B. Lefeuvre, S. Golhen, O. Cador, Y. Guyot, O. Maury and L. Ouahab, Magnetic and photo-physical investigations into DyIII and YbIII complexes involving tetrathiafulvalene ligand, *Inorg. Chem. Front.*, 2015, **2**, 1105–1117.

- 62 J. Long, Y. Guari, R. A. S. Ferreira, L. D. Carlos and J. Larionova, Recent advances in luminescent lanthanide based Single-Molecule Magnets, *Coord. Chem. Rev.*, 2018, **363**, 57–70.
- 63 Y. Huo, Y.-C. Chen, S.-G. Wu, J.-L. Liu, J.-H. Jia, W.-B. Chen, B.-L. Wang, Y.-Q. Zhang and M.-L. Tong, Effect of Bridging Ligands on Magnetic Behavior in Dinuclear Dysprosium Cores Supported by Polyoxometalates, *Inorg. Chem.*, 2019, **58**, 1301–1308.
- 64 G. Brunet, R. Marin, M. Monk, U. Resch-Genger, D. A. Galico, F. A. Sigoli, E. A. Sutura, E. Hemmer and M. Murugesu, Exploring the dual functionality of an ytterbium complex for luminescence thermometry and slow magnetic relaxation, *Chem. Sci.*, 2019, **10**, 6799–6808.
- 65 J.-H. Jia, Q.-W. Li, Y.-C. Chen, J.-L. Liu and M.-L. Tong, Luminescent single-molecule magnets based on lanthanides: Design strategies, recent advances and magneto-luminescent studies, *Coord. Chem. Rev.*, 2019, **378**, 365–381.
- 66 B. Casanovas, S. Speed, M. S. El Fallah, R. Vicente, M. Font-Bardia, F. Zinna and L. Di Bari, Chiral dinuclear Ln(III) complexes derived from S- and R-2-(6-methoxy-2-naphthyl)propionate. Optical and magnetic properties, *Dalton Trans.*, 2019, **48**, 2059–2067.
- 67 D.-P. Li, T.-W. Wang, C.-H. Li, D.-S. Liu, Y.-Z. Li and X.-Z. You, Single-ion magnets based on mononuclear lanthanide complexes with chiral Schiff base ligands [Ln(FTA)3L] (Ln = Sm, Eu, Gd, Tb and Dy), *Chem. Commun.*, 2010, **46**, 2929–2931.
- 68 X.-L. Li, C.-L. Chen, Y.-L. Gao, C.-M. Liu, X.-L. Feng, Y.-H. Gui and S.-M. Fang, Modulation of Homochiral Dy(III) Complexes: Single-Molecule Magnets with Ferroelectric Properties, *Chem. – Eur. J.*, 2012, **18**, 14632–14637.
- 69 X.-L. Li, C.-L. Chen, H.-P. Xiao, A.-L. Wang, C.-M. Liu, X. Zheng, L.-J. Gao, X.-G. Yang and S.-M. Fang, Luminescent, magnetic and ferroelectric properties of noncentrosymmetric chain-like complexes composed of nine-coordinate lanthanide ions, *Dalton Trans.*, 2013, **42**, 15325–15347.
- 70 J. Long, J. Rouquette, J.-M. Thibaud, R. A. S. Ferreira, L. D. Carlos, B. Donnadieu, V. Vieru, L. F. Chibotaru, L. Konczewicz, J. Haines, Y. Guari and J. Larionova, A High-Temperature Molecular Ferroelectric Zn/Dy Complex Exhibiting Single-Ion-Magnet Behavior and Lanthanide Luminescence, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2015, **54**, 2236–2240.
- 71 X.-L. Li, M. Hu, Z. Yin, C. Zhu, C.-M. Liu, H.-P. Xiao and S. Fang, Enhanced single-ion magnetic and ferroelectric properties of mononuclear Dy(III) enantiomeric pairs through the coordination role of chiral ligands, *Chem. Commun.*, 2017, **53**, 3998–4001.
- 72 K. Wang, S. Zeng, H. Wang, J. Dou and J. Jiang, Magneto-chiral dichroism in chiral mixed (phthalocyaninato)(porphyrinato) rare earth triple-decker SMMs, *Inorg. Chem. Front.*, 2014, **1**, 167–171.
- 73 K. Dhbaibi, L. Favereau and J. Crassous, Enantioenriched Helicenes and Helicenoids Containing Main-Group Elements (B, Si, N, P), *Chem. Rev.*, 2019, **119**, 8846–8953.
- 74 P. L. Polavarapu, J. He, J. Crassous and K. Ruud, Absolute Configuration of C76 from Optical Rotatory Dispersion, *ChemPhysChem*, 2005, **6**, 2535–2540.
- 75 J.-K. Ou-Yang, N. Saleh, G. Fernandez Garcia, L. Norel, F. Pointillart, T. Guizouarn, O. Cador, F. Totti, L. Ouahab, J. Crassous and B. Le Guennic, Improved slow magnetic relaxation in optically pure helicene-based Dy(III) single molecule magnets, *Chem. Commun.*, 2016, **52**, 14474–14477.
- 76 G. Fernandez Garcia, J. Flores Gonzalez, J.-K. Ou-Yang, N. Saleh, F. Pointillart, O. Cador, T. Guizouarn, F. Totti, L. Ouahab, J. Crassous and B. Le Guennic, Slow Magnetic Relaxation in Chiral Helicene-Based Coordination Complex of Dysprosium, *Magnetochemistry*, 2017, **3**, 2.
- 77 F. Pointillart, J.-K. Ou-Yang, G. Fernandez Garcia, V. Montigaud, J. Flores Gonzalez, R. Marchal, L. Favereau, F. Totti, J. Crassous, O. Cador, L. Ouahab and B. Le Guennic, Tetrathiafulvalene-Based Helicene Ligand in the Design of a Dysprosium Field-Induced Single-Molecule Magnet, *Inorg. Chem.*, 2019, **58**, 52–56.
- 78 M. Galland, F. Riobé, J. Ouyang, N. Saleh, F. Pointillart, V. Dorcet, B. Le Guennic, O. Cador, J. Crassous, C. Andraud, C. Monnereau and O. Maury, Helicenic Complexes of Lanthanides: Influence of the f-Element on the Intersystem Crossing Efficiency and Competition between Luminescence and Oxygen Sensitization, *Eur. J. Inorg. Chem.*, 2019, 118–125.
- 79 T. Hayano, T. Sakaguchi, H. Furuno, M. Ohba, H. Okawa and J. Inanaga, Characterization of Eu(III) Adsorbed onto Chitin and Chitosan by Time-resolved Laser-induced Fluorescence Spectroscopy, *Chem. Lett.*, 2003, **32**, 608–609.
- 80 H. Furuno, T. Hayano, T. Kambara, Y. Sugimoto, T. Hanamoto, Y. Tanaka, Y. Z. Jin, T. Kagawa and J. Inanaga, Chiral rare earth organophosphates as homogeneous Lewis acid catalysts for the highly enantioselective hetero-Diels–Alder reactions, *Tetrahedron*, 2003, **59**, 10509–10523.
- 81 H. Furuno, T. Kambara, Y. Tanaka, T. Hanamoto, T. Kagawa and J. Inanaga, Highly enantioselective homogeneous catalysis of chiral rare earth phosphates in the hetero-Diels–Alder reaction, *Tetrahedron Lett.*, 2003, **44**, 6129–6132.
- 82 H. Furuno, T. Hanamoto, Y. Sugimoto and J. Inanaga, Remarkably High Asymmetric Amplification in the Chiral Lanthanide Complex-Catalyzed Hetero-Diels–Alder Reaction: First Example of the Nonlinear Effect in ML3 System, *Org. Lett.*, 2000, **2**, 49–52.
- 83 S. Fukuzawa, K. Metoki and S. Esumi, Asymmetric Diels–Alder reactions in supercritical carbon dioxide catalyzed by rare earth complexes, *Tetrahedron*, 2003, **59**, 10445–10452.
- 84 S. Suzuki, H. Furuno, Y. Yokoyama and J. Inanaga, Asymmetric fluorination of β -keto esters catalyzed by

- chiral rare earth perfluorinated organophosphates, *Tetrahedron: Asymmetry*, 2006, **17**, 504–507.
- 85 N. Hara, M. Okazaki, M. Shizuma, S. Marumoto, N. Tajima, M. Fujiki and Y. Imai, Swapping Circularly Polarised Luminescence of Eu(III)-Binaphthyl Hybridized Luminophore with and without Oxymethylene Spacer, *ChemistrySelect*, 2017, **2**, 10317–10322.
 - 86 N. Koiso, Y. Kitagawa, T. Nakanishi, K. Fushimi and Y. Hasegawa, Eu(III) Chiral Coordination Polymer with a Structural Transformation System, *Inorg. Chem.*, 2017, **56**, 5741–5747.
 - 87 A. J. Jalilah, F. Asanoma and M. Fujiki, Unveiling controlled breaking of the mirror symmetry of Eu(fod)₃ with α - β -pinene and BINAP by circularly polarised luminescence (CPL), CPL excitation, and 19F-/31P{1H}-NMR spectra and Mulliken charges, *Inorg. Chem. Front.*, 2018, **5**, 2718–2733.
 - 88 M. F. Richardson, W. F. Wagner and D. E. Sands, Rare-earth tris(hexafluoroacetylacetonates) and related compounds, *J. Inorg. Nucl. Chem.*, 1968, **30**, 1275–1289.
 - 89 A. Ngo Ndimba, T. Roisnel, G. Argouarch and C. Lalli, Harvesting New Chiral Phosphotriesters by Phosphorylation of BINOL and Parent Bis-phenols, *Synthesis*, 2019, 865–873.
 - 90 G. M. Sheldrick, SHELXT – Integrated space-group and crystal-structure determination, *Acta Crystallogr., Sect. A: Found. Adv.*, 2015, **71**, 3–8.
 - 91 G. M. Sheldrick, Crystal structure refinement with SHELXL, *Acta Crystallogr., Sect. C: Struct. Chem.*, 2015, **71**, 3–8.
 - 92 M. J. Frisch, G. W. Trucks, H. B. Schlegel, G. E. Scuseria, M. A. Robb, J. R. Cheeseman, G. Scalmani, V. Barone, B. Mennucci, G. A. Petersson, *et al.*, *Gaussian 09 Revision, A.02*, Gaussian Inc., Wallingford, CT, USA, 2009.
 - 93 J. P. Perdew, K. Burke and M. Ernzerhof, Generalized Gradient Approximation Made Simple, *Phys. Rev. Lett.*, 1996, **77**, 3865–3868.
 - 94 C. Adamo and V. Barone, Toward reliable density functional methods without adjustable parameters: The PBE0 model, *J. Chem. Phys.*, 1999, **110**, 6158–6170.
 - 95 F. Weigend and R. Ahlrichs, Balanced basis sets of split valence, triple zeta valence and quadruple zeta valence quality for H to Rn: Design and assessment of accuracy, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2005, **7**, 3297–3305.
 - 96 J. Tomasi, B. Mennucci and R. Cammi, Quantum Mechanical Continuum Solvation Models, *Chem. Rev.*, 2005, **105**, 2999–3093.
 - 97 M. Cossi and V. Barone, Time-dependent density functional theory for molecules in liquid solutions, *J. Chem. Phys.*, 2001, **115**, 4708–4717.
 - 98 R. Improta, V. Barone, G. Scalmani and M. J. A. Frisch, A state-specific polarizable continuum model time dependent density functional theory method for excited state calculations in solution, *J. Chem. Phys.*, 2006, **125**, 054103–054109.
 - 99 M. Dolg, H. Stoll and H. Preuss, A combination of quasirelativistic pseudopotential and ligand field calculations for lanthanoid compounds, *Theor. Chim. Acta*, 1993, **85**, 441–450.
 - 100 G. te Velde, F. M. Bickelhaupt, E. J. Baerends, C. Fonseca Guerra, S. J. A. van Gisbergen, J. G. Snijders and T. Ziegler, Chemistry with ADF, *J. Comput. Chem.*, 2001, **22**, 931–967.
 - 101 C. Fonseca Guerra, J. G. Snijders, G. te Velde and E. J. Baerends, Towards an order-N DFT method, *Theor. Chem. Acc.*, 1998, **99**, 391.
 - 102 E. J. Baerends, T. Ziegler, A. J. Atkins, J. Autschbach, D. Bashford, O. Baseggio, A. Bérces, F. M. Bickelhaupt, C. Bo, P. M. Boerrigter, L. Cavallo, C. Daul, D. P. Chong, D. V. Chulhai, L. Deng, R. M. Dickson, J. M. Dieterich, D. E. Ellis, M. van Faassen, A. Ghysels, A. Giammona, S. J. A. van Gisbergen, A. Goetz, A. W. Götz, S. Gusarov, F. E. Harris, P. van den Hoek, Z. Hu, C. R. Jacob, H. Jacobsen, L. Jensen, L. Joubert, J. W. Kaminski, G. van Kessel, C. König, F. Kootstra, A. Kovalenko, M. Krykunov, E. van Lenthe, D. A. McCormack, A. Michalak, M. Mitoraj, S. M. Morton, J. Neugebauer, V. P. Nicu, L. Noodleman, V. P. Osinga, S. Patchkovskii, M. Pavanello, C. A. Peebles, P. H. T. Philipsen, D. Post, C. C. Pye, H. Ramanantoanina, P. Ramos, W. Ravenek, J. I. Rodríguez, P. Ros, R. Rüger, P. R. T. Schipper, D. Schlüns, H. van Schoot, G. Schreckenbach, J. S. Seldenthuis, M. Seth, J. G. Snijders, M. M. S. Solà, M. Swart, D. Swerhone, G. te Velde, V. Tognetti, P. Vernooijs, L. Versluis, L. Visscher, O. Visser, F. Wang, T. A. Wesolowski, E. M. van Wezenbeek, G. Wiesenekker, S. K. Wolff, T. K. Woo and A. L. Yakovlev, “ADF2017, SCM, Theoretical Chemistry, Vrije Universiteit, Amsterdam, The Netherlands, <https://www.scm.com>”, 2017.
 - 103 M. Ernzerhof and G. E. Scuseria, Assessment of the Perdew–Burke–Ernzerhof exchange–correlation functional, *J. Chem. Phys.*, 1999, **110**, 5029–5036.
 - 104 E. van Lenthe and E. J. Baerends, Optimized Slater-type basis sets for the elements 1–118, *J. Comput. Chem.*, 2003, **24**, 1142–1156.
 - 105 E. van Lenthe, E. J. Baerends and J. G. Snijders, Relativistic regular two-component Hamiltonians, *J. Chem. Phys.*, 1993, **99**, 4597–4610.
 - 106 C. C. Pye and T. Ziegler, An implementation of the conductor-like screening model of solvation within the Amsterdam density functional package, *Theor. Chem. Acc.*, 1999, **101**, 396–408.
 - 107 G. Schreckenbach and T. Ziegler, Combined Density Functional Theory and Intrinsic Reaction Coordinate Study on the Conrotatory Ring-Opening of Cyclobutene, *J. Phys. Chem.*, 1995, **99**, 606–611.
 - 108 S. De, D. Flambard, D. Garnier, P. Herson, P. Köhler, A. Mondal, K. Costuas, B. Gillon, R. Lescouëzec, B. Le Guennic and F. Gendron, *Chem. – Eur. J.*, 2019, **25**, 12120–12136.
 - 109 I. F. Galván, M. Vacher, A. Alavi, C. Angeli, F. Aquilante, J. Autschbach, J. J. Bao, S. I. Bokarev, N. A. Bogdanov,

- R. K. Carlson, L. F. Chibotaru, J. Creutzberg, N. Dattani, M. G. Delcey, S. S. Dong, A. Dreuw, L. Freitag, L. M. Frutos, L. Gagliardi, F. Gendron, A. Giussani, L. González, G. Grell, M. Guo, C. E. Hoyer, M. Johansson, S. Keller, S. Knecht, G. Kovačević, E. Källman, G. Li Manni, M. Lundberg, Y. Ma, S. Mai, J. P. Malhado, P. Å. Malmqvist, P. Marquetand, S. A. Mewes, J. Norell, M. Olivucci, M. Oppel, Q. M. Phung, K. Pierloot, F. Plasser, M. Reiher, A. M. Sand, I. Schapiro, P. Sharma, C. J. Stein, L. K. Sørensen, D. G. Truhlar, M. Ugandi, L. Ungur, A. Valentini, S. Vancoillie, V. Veryazov, O. Weser, T. A. Wesolowski, P.-O. Widmark, S. Wouters, A. Zech, J. P. Zobel and R. Lindh, OpenMolcas: From Source Code to Insight, *J. Comput. Chem.*, 2019, **15**, 5925–5964.
- 110 B. O. Roos, P. R. Taylor and P. E. M. Siegbahn, A complete active space SCF method (CASSCF) using a density matrix formulated super-CI approach, *Chem. Phys.*, 1980, **48**, 157–173.
- 111 M. Douglas and N. M. Kroll, Quantum electrodynamical corrections to the fine structure of helium, *Ann. Phys.*, 1974, **82**, 89–155.
- 112 B. A. Hess, Applicability of the no-pair equation with free-particle projection operators to atomic and molecular structure calculations, *Phys. Rev. A*, 1985, **32**, 756–763.
- 113 B. A. Hess, Relativistic electronic-structure calculations employing a two-component no-pair formalism with external-field projection operators, *Phys. Rev. A*, 1986, **33**, 3742–3748.
- 114 A. Wolf, M. Reiher and B. A. Hess, The generalized Douglas–Kroll transformation, *J. Chem. Phys.*, 2002, **117**, 9215–9226.
- 115 P.-O. Widmark, P.-A. Malmqvist and B.-O. Roos, Density matrix averaged atomic natural orbital (ANO) basis sets for correlated molecular wave functions, *Theor. Chim. Acta*, 1990, **77**, 291–306.
- 116 B. O. Roos, R. Lindh, P.-A. Malmqvist, V. Veryazov and P.-O. Widmark, Main Group Atoms and Dimers Studied with a New Relativistic ANO Basis Set, *J. Phys. Chem. A*, 2004, **108**, 2851–2858.
- 117 B. O. Roos, R. Lindh, P.-A. Malmqvist, V. Veryazov and P.-O. Widmark, New Relativistic ANO Basis Sets for Transition Metal Atoms, *J. Phys. Chem. A*, 2005, **109**, 6575.
- 118 P.-A. Malmqvist, B. O. Roos and B. Schimmelpfennig, The restricted active space (RAS) state interaction approach with spin-orbit coupling, *Chem. Phys. Lett.*, 2002, **357**, 230–240.
- 119 H. Bolvin, An Alternative Approach to the g-Matrix: Theory and Applications, *ChemPhysChem*, 2006, **7**, 1575–1589.
- 120 L. F. Chibotaru and L. Ungur, Ab initio calculation of anisotropic magnetic properties of complexes. I. Unique definition of pseudospin Hamiltonians and their derivation, *J. Chem. Phys.*, 2012, **137**, 064112–064122.
- 121 M. Llunell, D. Casanova, J. Cirera, P. Alemany and S. Alvarez, S. SHAPE Program for the Stereochemical Analysis of Molecular Fragments by Means of Continuous Shape Measures and Associated Tools; Departament de Química Física, Departament de Química Inorgànica, and Institut de Química Teòrica i Computacional - Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain.
- 122 A. W. J. Poh, J. A. A. Aguilar, A. M. Kenwright, K. Mason and D. Parker, Aggregation of Rare Earth Coordination Complexes in Solution Studied by Paramagnetic and DOSY NMR, *Chem. – Eur. J.*, 2018, **24**, 16170–16175.
- 123 S. Denis-Quanquin, F. Riobé, M.-A. Delsuc, O. Maury and N. Giraud, Paramagnetic DOSY: An Accurate Tool for the Analysis of the Supramolecular Interactions between Lanthanide Complexes and Proteins, *Chem. – Eur. J.*, 2016, **22**, 18123–18131.
- 124 R. Evans, Z. Deng, A. K. Rogerson, A. S. McLachlan, J. J. Richards, M. Nilsson and G. A. Morris, Quantitative Interpretation of Diffusion-Ordered NMR Spectra: Can We Rationalize Small Molecule Diffusion Coefficients?, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2013, **52**, 3199–3202.
- 125 R. Evans, G. D. Poggetto, M. Nilsson and G. A. Morris, Improving the Interpretation of Small Molecule Diffusion Coefficients, *Anal. Chem.*, 2018, **90**, 3987–3994.
- 126 S. Di Pietro, S. Lo Piano and L. Di Bari, Pseudocontact shifts in lanthanide complexes with variable crystal field parameters, *Coord. Chem. Rev.*, 2011, **255**, 2810–2820.
- 127 O. Kahn and M. Magnetism, *Wiley-VCH*, Weinheim, Germany, 1993.
- 128 J. M. Zadrozny, M. Atanasov, A. M. Bryan, C.-Y. Lin, B. D. Reinken, P. P. Power, F. Neese and J. R. Long, Slow magnetization dynamics in a series of two coordinate iron (II) complexes, *Chem. Sci.*, 2013, **4**, 125–138.
- 129 M. Feng, F. Pointillart, B. Lefevre, V. Dorcet, S. Golhen, O. Cador and L. Ouahab, Multiple Single-Molecule Magnet Behaviors in Dysprosium Dinuclear Complexes Involving a Multiple Functionalized Tetrathiafulvalene Based Ligand, *Inorg. Chem.*, 2015, **54**, 4021–4028.
- 130 O. Galangau, V. Montigaud, J. Flores Gonzalez, B. Lefevre, V. Dorcet, B. Le Guennic, O. Cador, L. Ouahab and F. Pointillart, N3O6 versus N2O6 coordinated dysprosium slow magnetic relaxation in a tetrathiafulvalene-based dinuclear complex, *Polyhedron*, 2019, **168**, 28–36.
- 131 B. Lefevre, O. Galangau, J. Flores Gonzalez, V. Montigaud, V. Dorcet, L. Ouahab, B. Le Guennic, O. Cador and F. Pointillart, Field-Induced Dysprosium Single-Molecule Magnet Based on a Redox-Active Fused 1,10-Phenanthroline-Tetrathiafulvalene-1,10-Phenanthroline Bridging Triad, *Front. Chem.*, 2018, **6**, 552–562.
- 132 L. T. A. Ho and L. F. Chibotaru, Intermolecular mechanism for multiple maxima in molecular dynamic susceptibility, *Phys. Rev. B*, 2018, **98**, 174418.
- 133 A. B. Canaj, M. K. Singh, C. Wilson, G. Rajaraman and M. Murrie, Chemical and in silico tuning of the magnetization reversal barrier in pentagonal bipyramide Dy(III) single-ion magnets, *Chem. Commun.*, 2018, **54**, 8273–8276.
- 134 Y. Gil, L. Llanos, P. Cancino, P. Fuentealba, A. Vega, E. Spodine and D. Aravena, Effect of Second-Sphere

- Interactions on the Magnetic Anisotropy of Lanthanide Single-Molecule Magnets: Electrostatic Interactions and Supramolecular Contacts, *J. Phys. Chem. C*, 2020, **124**, 5308–5320.
- 135 L. T. A. Ho and L. F. Chibotaru, Multiple relaxation times in single-molecule magnets, *Phys. Rev. B*, 2016, **94**, 104422.
 - 136 G. Cosquer, F. Pointillart, J. Jung, B. Le Guennic, S. Golhen, O. Cador, Y. Guyot, A. Brenier, O. Maury and L. Ouahab, Alkylation Effects in Lanthanide Complexes Involving Tetrathiafulvalene Chromophores: Experimental and Theoretical Correlation between Magnetism and Near-Infrared Emission, *Eur. J. Inorg. Chem.*, 2014, 69–82.
 - 137 G. Cosquer, F. Pointillart, S. Golhen, O. Cador and L. Ouahab, Slow Magnetic Relaxation in Condensed versus Dispersed Dysprosium(III) Mononuclear Complexes, *Chem. – Eur. J.*, 2013, **19**, 7895.
 - 138 F. Habib, P. H. Lin, J. Long, I. Korobkov, W. Wernsdorfer and M. Murugesu, The Use of Magnetic Dilution To Elucidate the Slow Magnetic Relaxation Effects of a Dy² Single-Molecule Magnet, *J. Am. Chem. Soc.*, 2011, **133**, 8830–8833.
 - 139 X. Yi, K. Bernot, V. Le Corre, G. Calvez, F. Pointillart, O. Cador, B. Le Guennic, J. Jung, O. Maury, V. Placide, Y. Guyot, T. Roisnel, C. Daiguebonne and O. Guillou, Unraveling the Crystal Structure of Lanthanide–Murexide Complexes: Use of an Ancient Complexometry Indicator as a Near-Infrared-Emitting Single-Ion Magnet, *Chem. – Eur. J.*, 2014, **20**, 1569–1576.
 - 140 F. Pointillart, J. Jung, R. Berraud-Pache, B. Le Guennic, V. Dorcet, S. Golhen, O. Cador, O. Maury, Y. Guyot, S. Decurtins, S.-X. Liu and L. Ouahab, Luminescence and Single-Molecule Magnet Behavior in Lanthanide Complexes Involving a Tetrathiafulvalene-Fused Dipyridophenazine Ligand, *Inorg. Chem.*, 2015, **54**, 5384–5397.
 - 141 G. Pescitelli, L. Di Bari and N. Berova, Conformational aspects in the studies of organic compounds by electronic circular dichroism, *Chem. Soc. Rev.*, 2011, **40**, 4603–4625.
 - 142 N. Berova, L. Di Bari and G. Pescitelli, Application of electronic circular dichroism in configurational and conformational analysis of organic compounds, *Chem. Soc. Rev.*, 2007, **36**, 914–931.
 - 143 L. Di Bari, G. Pescitelli and P. Salvadori, Conformational Study of 2,2'-Homosubstituted 1,1'-Binaphthyls by Means of UV and CD Spectroscopy, *J. Am. Chem. Soc.*, 1999, **121**, 7998–8004.
 - 144 S. Guy, A. Bensalah-Ledoux, A. Lambert, Y. Guillin, L. Guy and J. C. Mulatier, Chiral organic thin films: How far pulsed laser deposition can conserve chirality, *Thin Solid Films*, 2012, **520**, 6440–6445.
 - 145 T. Kimoto, N. Tajima, M. Fujiki and Y. Imai, Control of Circularly Polarized Luminescence by Using Open- and Closed-Type Binaphthyl Derivatives with the Same Axial Chirality, *Chem. – Asian J.*, 2012, **7**, 2836–2841.
 - 146 T. Kinuta, N. Tajima, M. Fujiki, M. Miyazawa and Y. Imai, Control of circularly polarized photoluminescent property via dihedral angle of binaphthyl derivatives, *Tetrahedron*, 2012, **68**, 4791–4796.
 - 147 T. Sato, N. Tajima, H. Ueno, T. Harada, M. Fujiki and Y. Imai, Binaphthyl luminophores with triphenylsilyl groups: sign inversion of circularly polarized luminescence and circular dichroism, *Tetrahedron*, 2016, **72**, 7032–7038.
 - 148 K. Binnemans, Interpretation of europium(III) spectra, *Coord. Chem. Rev.*, 2015, **295**, 1–45.
 - 149 C. Freund, W. Porzio, U. Giovannella, F. Vignali, M. Pasini, S. Destri, A. Mech, S. Di Pietro, L. Di Bari and P. Mineo, Thiophene Based Europium β -Diketonate Complexes: Effect of the Ligand Structure on the Emission Quantum Yield, *Inorg. Chem.*, 2011, **50**, 5417–5429.
 - 150 A. Zaïm, H. Nozary, L. Guénée, C. Besnard, J.-F. Lemmonier, S. Petoud and C. Piguet, N-Heterocyclic Tridentate Aromatic Ligands Bound to [Ln(hexafluoroacetylacetonate)₃] Units: Thermodynamic, Structural, and Luminescent Properties, *Chem. – Eur. J.*, 2012, **18**, 7155–7168.