

La RMN du phosphore en biologie

par C. Chachaty

(Département de physico-chimie, Centre d'Études Nucléaires de Saclay, B.P. n° 2, 91190 Gif-sur-Yvette)



Après avoir rappelé quelques caractéristiques de la RMN des composés organophosphorés, on passe en revue les principales informations que donne la résonance de ^{31}P sur la conformation de certaines molécules biologiques.

La conformation des groupes phosphoesters des mono- et dinucléotides peut être déduite d'une manière simple des couplages $^3J_{\text{PH}}$ et $^3J_{\text{PC}}$ qui donnent les angles dièdres POCH et POCC. La variation de $^3J_{\text{PH}}$ avec le pH traduit les changements de conformation du groupe phosphoester avec son degré

de protonation. Dans le cas des oligonucléotides et polynucléotides, la variation avec la température du déplacement chimique de ^{31}P peut être corrélée avec la transition entre une forme hélicoïdale où les bases sont associées, et une forme non ordonnée. La relaxation longitudinale du phosphore ainsi que l'effet Overhauser $^{31}\text{P}\text{-}\{^1\text{H}\}$ donnent également des informations sur la conformation et le comportement dynamique de phospholipides et de polynucléotides en solution. C'est ainsi que l'on peut suivre les différentes étapes de la dénaturation de l'ARN de transfert en fonction de la température. La conformation de complexes de molécules phosphorées telles que l'ATP avec les ions métalliques divalents est également étudiée par la relaxation de ^{31}P induite par le spin électronique. Enfin, la RMN du phosphore convient particulièrement bien à l'étude de cellules ou de tissus intacts et même d'organes maintenus en activité par perfusion après prélèvement.

I. Généralités sur la RMN du phosphore

Parmi les noyaux observables par Résonance Magnétique Nucléaire le phosphore-31 se situe immédiatement après le proton et le fluor au point de vue de la sensibilité de détection. Comme ces deux noyaux, il possède un spin de 1/2. Sa fréquence de résonance dans un champ magnétique de 23,5 kgauss est de 40 MHz, contre 100 MHz pour le proton. Bien que l'abondance naturelle du phosphore-31 soit de 100 %, sa sensibilité de détection n'est que 6 % de celle du proton. Elle est cependant bien supérieure à celle d'autres noyaux importants tels que le carbone-13, l'azote-14 ou 15, l'oxygène-17 et le deutérium. Du point de vue expérimental, la RMN du phosphore ne présente pas de difficultés majeures, en particulier depuis la mise en œuvre de la transformée de Fourier. Jusqu'à ces deux ou trois dernières années la plupart des travaux sur la RMN du phosphore ont été effectués à champ moyen, c'est-à-dire dans des champs magnétiques de 14 à 23,5 kgauss. L'usage des spectromètres à haut champ et à aimant supraconducteur pour l'étude de ce noyau tend à se généraliser. L'optimum de sensibilité paraît se situer à une fréquence de 80 MHz, ce qui correspond à un champ d'environ 50 kgauss. A champ plus élevé, la sensibilité se trouve réduite par un élargissement de raie qui augmente comme le carré du champ. Cet élargissement est dû au

mécanisme de relaxation nucléaire par anisotropie du déplacement chimique.

Depuis 1960, un nombre considérable de travaux ont été consacrés à la RMN des dérivés organophosphorés dont une grande partie se trouve résumée dans la monographie de Mavel (1). Grâce aux progrès techniques récents, la RMN du phosphore dans les systèmes biologiques est en plein développement et permet actuellement des observations dans des cellules ou des tissus intacts.

Avant d'aborder cette question, rappelons quelques caractéristiques de la RMN de ce noyau. Tout d'abord, le domaine de déplacement chimique du phosphore est particulièrement étendu puisqu'il varie de + 500 ppm à - 250 ppm par rapport à l'acide phosphorique pris comme référence. Le déplacement chimique de ^{31}P provient de l'effet d'écran créé par la circulation des électrons *p* et *d* du phosphore dont les populations respectives varient selon le nombre de coordination de ce noyau qui peut aller de 3 à 6, de l'électronégativité des groupes adjacents et des angles de liaison. Pour les composés phosphorés d'intérêt biologique, qui dérivent tous de l'acide phosphorique, le

domaine des déplacements chimiques n'est que de quelques ppm, mais cette faible variation donne, comme on le verra plus loin, un certain nombre d'informations sur la conformation et l'ionisation des groupes phosphoesters.

De même que le déplacement chimique, le couplage direct $^1\text{J}_{\text{PH}}$ proton-phosphore, qui est toujours positif, dépend considérablement du degré de coordination du phosphore et de la nature des ligands et peut varier d'une centaine à un millier de Hz. Les couplages phosphore-proton à travers deux ou trois liaisons $^2\text{J}_{\text{PCH}}$ et $^3\text{J}_{\text{PCCH}}$ sont stéréospécifiques et dépendent en signe et en grandeur de l'orientation de la liaison C - H par rapport aux autres liaisons qui partent du phosphore.

Dans le domaine de la RMN des composés d'intérêt biologique, nous examinerons successivement les informations que l'on peut extraire du couplage du phosphore avec le proton et le carbone 13, du déplacement chimique du phosphore et enfin, de sa relaxation nucléaire induite par les protons voisins ou par un ion métallique paramagnétique.

II. Couplages ^{31}P - ^1H et ^{31}P - ^{13}C dans les groupes phosphoesters

II.1. Dépendance angulaire des couplages $^3\text{J}_{\text{PH}}$ et $^3\text{J}_{\text{PC}}$

Le couplage phosphore-proton à travers trois liaisons ^3J est particulièrement important car il donne la conformation locale des

groupes phosphoesters. Il a fait l'objet d'une première étude systématique par Tsuboi et coll. (2) qui ont déterminé les couplages protons-phosphore dans les spectres de résonance protonique d'une dizaine d'esters de l'acide phosphorique. Dans de tels composés, le couplage observé peut être considéré comme une moyenne pondérée entre les couplages des conformères *trans* et *gauche* du fragment POCH.

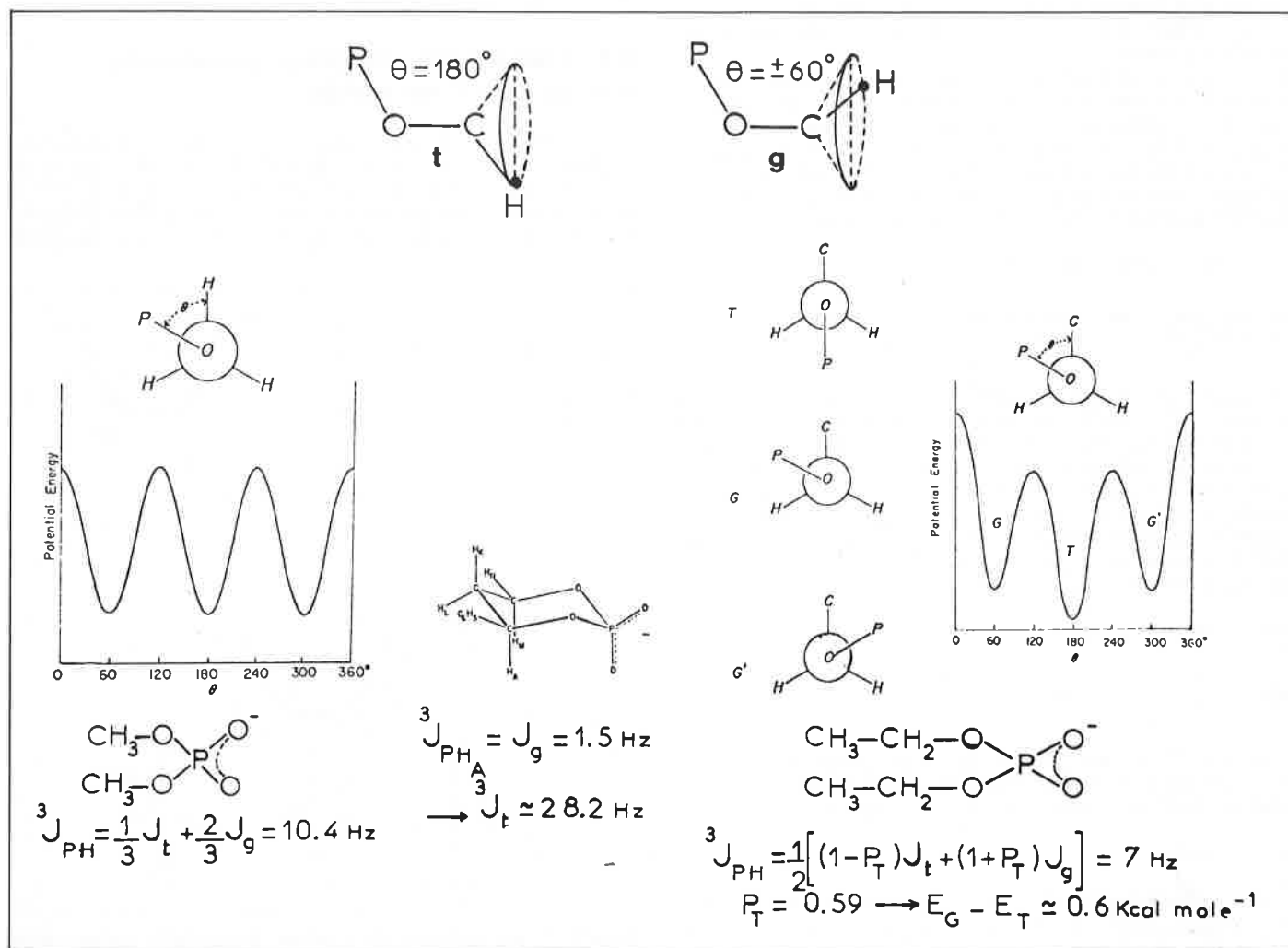


Figure 1. Dépendance angulaire de $^3\text{J}_{\text{PH}}$ dans les groupes phosphoesters (reproduit en partie d'après la référence 2).

On montre facilement que le couplage équivalent des trois protons du phosphate de méthyle est donné par la relation :

$$J_{HP} = \frac{1}{3} J_t + \frac{2}{3} J_g \quad \text{avec} \quad J_{HP} = 10,4 \text{ Hz} \quad (I)$$

La constante J_g est donnée par le phosphate cyclique de phényl-1 propanediol-1,3 bloqué dans la forme chaise par le groupe phényle : l'angle dièdre H1COP étant de 60° , $J_g = J_{HP} = 1,5 \text{ Hz}$ et la relation I nous donne $J_t = 28,2 \text{ Hz}$.

Connaissant J_t et J_g , il est possible d'évaluer, d'après le couplage moyen du phosphore avec le proton, la probabilité des conformères *trans* et *gauche* des groupes phosphoesters. Ainsi pour les deux protons α du phosphate d'éthyle, on a :

$${}^3J_{HP} = \frac{1}{2} [(1 - P_T)J_t + (1 + P_T)J_g] = 7 \text{ Hz} \quad (II)$$

on en déduit que la probabilité de la forme *trans* T est de 0,59 et que son énergie potentielle est de 0,6 kcal. mole⁻¹ plus basse que celle des formes *gauche* G ou G' (Figure 1).

La dépendance angulaire du couplage ${}^3J_{PH}$ a été également étudiée par White et Verkade (3) à partir d'une vingtaine de phosphites et de phosphates mono- et polycycliques rigides, de conformation connue, qui donnent des angles dièdres POCH compris entre 60° et 180° . Entre ces deux extrêmes les couplages ${}^3J_{HP}$ varient de 0,30 à 24 Hz, en accord raisonnable avec les valeurs des constantes données par Tsuboi et coll. (2) qui donnent une variation de 1,5 à 28 Hz. Plus récemment, Smith et coll. (4) ont étudié le couplage ${}^3J_{PH}$ dans les 3'-5' nucléotides cycliques, en particulier le 3',5' adénosine mono-phosphate cyclique.

On sait, d'après les études aux rayons X des nucléotides cycliques, que le cycle contenant le phosphore est bloqué dans la forme chaise et que, par conséquent, le couplage *trans* J_t est donné par ${}^3J_{H_5P} = 20,9 \text{ Hz}$, le couplage *gauche* par $J_g = {}^3J_{H_3P}$ ou ${}^3J_{H_5P} = 1,8 \text{ Hz}$. Par analogie avec la loi de Karplus qui définit le couplage vicinal de deux protons, Smith et coll. ont proposé pour la dépendance angulaire du couplage ${}^3J_{PH}$, la relation :

$${}^3J_{HP} = 16,3 \cos^2 \theta - 4,6 \cos \theta \quad (III)$$

généralement utilisée dans le cas des nucléotides, où θ désigne l'angle dièdre POCH.

Ces mêmes auteurs ont également étudié le couplage phosphore carbone ${}^{13}J_{PC}$ dans les nucléotides 3'-5' cycliques (5). Alors que le couplage P-H peut être étudié en observant, soit le proton, soit le phosphore, le couplage phosphore-carbone 13 ne peut être mesuré qu'en RMN du carbone 13 en raison de la faible abondance isotopique de ce noyau. Étant donné la conformation chaise du cycle à 6 atomes contenant le phosphore il apparaît que le fragment POC_3C_2 est *trans* alors que les fragments POC_3C_4 et POC_5C_4 sont *gauches*. Les valeurs expérimentales donnent :

$${}^3J_{PC}^{trans} = {}^3J_{PC_2'} = 8 \text{ Hz}$$

et

$${}^3J_{PC}^{gauche} = \frac{1}{2} {}^3J_{PC_4'} = 2,3 \text{ Hz}$$

le facteur 1/2 provenant de ce que le phosphore est couplé au carbone 4' par deux voies différentes (Figure 2). Compte tenu de ces résultats, Smith (5) a proposé la relation empirique :

$${}^3J_{CP} = 8 \cos^2 \gamma \quad (IV)$$

γ étant l'angle dièdre CCOP. Cette relation est très utile pour déterminer la conformation des groupes phosphoesters lorsque les spectres de résonance du phosphore et du proton sont trop mal résolus ou trop complexes pour permettre de déterminer le couplage ${}^3J_{PH}$.

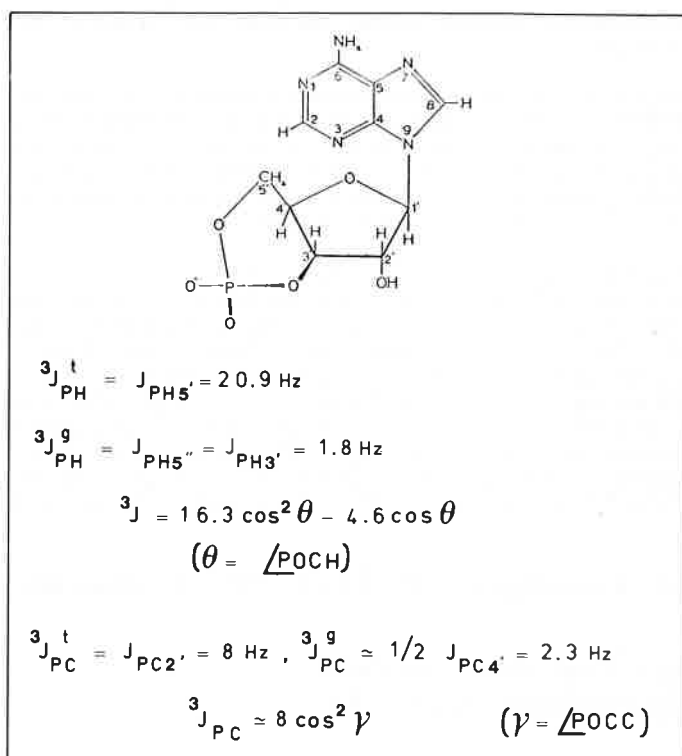


Figure 2. Couplages ${}^3J_{PH}$ et ${}^3J_{PC}$ dans le 3' → 5' adénosine mono-phosphate cyclique.

II.2. Conformation du groupe phosphoester dans les 3' et 5' nucléotides

Les relations I et II qui donnent la dépendance angulaire des couplages ${}^3J_{PH}$ et ${}^3J_{PC}$ ont été utilisées par Danyluk et coll. pour déterminer les rotamères du groupe phosphoester dans les 2', 3' et 5' nucléotides (6, 7) ainsi que dans les dinucléotides (8). Dans le cas des 3' nucléotides, les populations P_I , P_{II} et P_{III} de ces rotamères

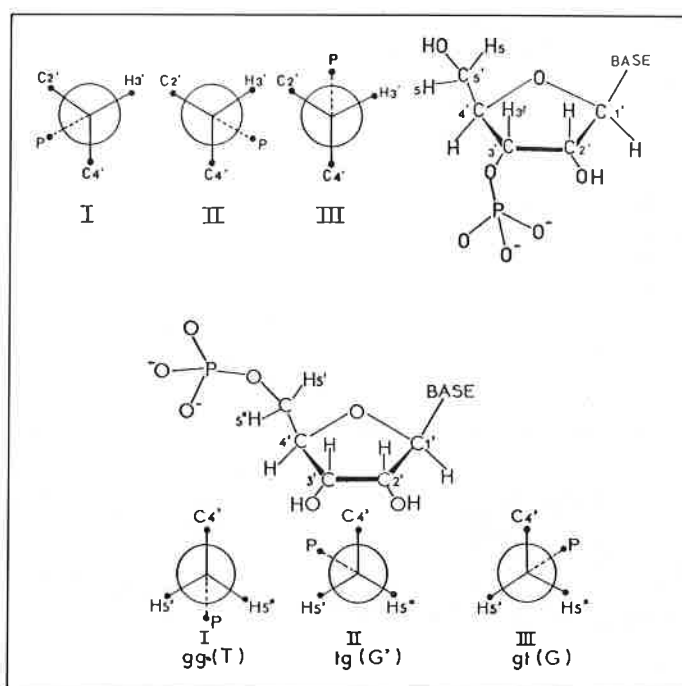


Figure 3. Rotamères du groupe phosphate autour des liaisons C3'-O3' et C5'-O5' des 3' et 5' nucléosides mono-phosphates.

(Figure 3) sont obtenus à partir des couplages du phosphore avec les carbones C2' et C4' :

$$P_I = \frac{(J'_t + J'_g) - (J'_{PC2'} + J'_{PC4'})}{J'_t - J'_g} \quad (Va)$$

$$P_{II} = \frac{J'_{PC2'} - J'_g}{J'_t - J'_g} \quad (Vb)$$

$$P_{III} = \frac{J'_{PC4'} - J'_g}{J'_t - J'_g} \quad (Vc)$$

en prenant $J'_t = 8 \text{ Hz}$, $J'_g \approx 2,3 \text{ Hz}$ (relation IV).

On vérifie aisément la compatibilité des relations I et II en calculant à partir des populations ainsi obtenues, le couplage $^3J_{PH3'}$:

$$^3J_{PH3'} = 20,9 P_I + 1,8 (P_{II} + P_{III}) \quad (VI)$$

que l'on compare à la valeur expérimentale. Dans le cas du 3' uridine monophosphate, on a par exemple :

$J_{PC2'}$	$J_{PC4'}$	P_I	P_{II}	P_{III}	$J_{PH3'}^{calc.}$	$J_{PH3'}^{exp.}$
2,5 Hz	6,0 Hz	0,32	0,04	0,64	7,7 Hz	8,0 Hz

La population des rotamères du groupe phosphate des 5' nucléotides est donnée de même par les couplages $^3J_{PH5'}$ et $^3J_{PH5''}$:

$$P_I = \frac{(J_t + J_g) - (J_{PH5'} + J_{PH5''})}{J_t - J_g} \quad (VIIa)$$

$$P_{II} = \frac{J_{PH5''} - J_g}{J_t - J_g} \quad (VIIb)$$

$$P_{III} = \frac{J_{PH5'} - J_g}{J_t - J_g} \quad (VIIc)$$

III. Déplacement chimique de ^{31}P dans les nucléotides et polynucléotides Effets du pH et de la température

Le déplacement chimique du phosphore dans les mononucléotides dépend fortement du pH (10). La neutralisation complète du groupe phosphate entraîne une variation d'environ 5 ppm, l'ionisation primaire se situant à pH 1,6-1,7 et l'ionisation secondaire entre pH 5,7 et pH 6,3 selon la nature du mononucléotide. La variation du déplacement chimique en fonction du pH est, par contre, très faible pour les nucléotides 3'-5' cycliques ou pour les dinucléotides. Le déplacement chimique du phosphore en fonction du pH peut être considéré comme résultant de trois facteurs : la densité électronique sur les oxygènes liés au phosphore, la population des orbitales $d\pi$ du phosphore et l'angle O-P-O. Ce dernier facteur a été plus particulièrement étudié par Gorenstein (11), en déterminant sur une série de phosphoesters la relation entre l'angle O-P-O donné par diffraction de rayons X et le déplacement chimique observé en RMN pour ces mêmes composés en solution.

Gorenstein et coll. (12) ont étudié également la variation en fonction de la température du déplacement chimique du phosphore dans les polynucléotides. Cette variation est liée aux angles de torsion autour

IV. Déplacement chimique de ^{31}P et couplages $^1J_{P-P}$ dans l'ATP

L'un des composés phosphorés les plus importants est l'adénosine triphosphate (ATP) qui intervient dans un grand nombre de réactions biologiques. Il a fait l'objet de nombreuses études en RMN du proton et du phosphore. Parmi ces dernières nous mentionnerons celle, particulièrement originale, de Labotka, Glonek et Myers (13) qui met en œuvre le déplacement chimique du phosphore ainsi que le couplage ^{31}P - ^{31}P . Des mesures comparatives de ces deux paramètres ont été effectuées en solution aqueuse ou en milieu polaire anhydre de tétraméthylurée. En effet, les milieux intracellulaires où

avec

$$J_g = 1,8 \text{ Hz}, J_t = 20,9 \text{ Hz}.$$

Pour la plupart des 5' nucléotides, il apparaît que le rotamère I (gauche-gauche) est prédominant avec $P_I = 0,7-0,8$.

Le couplage phosphore-proton, à travers 3 ou 4 liaisons $^3J_{PH}$ et $^4J_{PH}$, a été étudié également par Cozzone et Jardetzky (9) par observation de la résonance du phosphore de plusieurs 3' et 5' nucléosides monophosphates, de leurs analogues 3'-5' cycliques et de dinucléotides, en fonction du pH et de la température.

Pour tous les 5' nucléosides monophosphates, le couplage $^3J_{PH}$ indique que le rotamère *gg* autour de la liaison C5'-O5' est largement prédominant avec une proportion de 85 % indépendamment du pH et de la température. Pour les 3' nucléotides monophosphates, c'est le rotamère gauche (III) autour de C3'-O3' qui est majoritaire. Le couplage $^3J_{PH3'}$ diminue lorsqu'on augmente le pH, ce qui indique l'existence d'une interaction entre le groupe phosphate et le groupe OH en position 2' ; en effet, cette variation n'est pas observée pour les 3' désoxyribonucléotides monophosphates où le groupe OH est remplacé par un hydrogène. Les conformères préférentiels du groupe phosphate des dinucléotides autour des liaisons C3'-O3' et C5'-O5' sont les mêmes que pour les mononucléotides, mais avec une plus forte proportion, qui reflète une liberté de rotation plus restreinte au voisinage de ce groupe.

La valeur maximale du couplage $^4J_{PH}$, qui est de 2,7 Hz, correspond à une conformation plane en W du fragment P-O-C-C-H. Dans le cas des 5' ribonucléotides, la variation de $^4J_{PH4'}$ en fonction du pH indique que ce couplage est maximum lorsque le groupe phosphate est biprotoné en dessous de pH 1, et diminue avec les deux ionisations successives du groupe phosphate pour atteindre une limite de 1 Hz vers pH 11. Pour tous les 3' mononucléotides, les couplages $^4J_{PH}$ avec H2' et H3' sont très faibles, de l'ordre de 0,3 à 0,9 Hz.

des liaisons O-P du groupe phosphoester. Ainsi le déplacement chimique du phosphore d'un phosphodiester monoanion dans la conformation *gauche-gauche* du fragment C3'-O3'-P-O5'-C5' est situé à 10 ppm à plus haut champ que pour le conformère *gauche-trans* (Figure 4).

Cette variation de déplacement chimique donne une information sur la conformation de dinucléotides monophosphates, dinucléotides diphosphates ou d'acides polyribonucléiques autour des groupes phosphoesters. Pour chacun de ces composés on peut définir une température ou zone de température, dite de fusion, qui correspond à une transition entre une structure rigide hélicoïdale avec superposition des bases et une structure « ouverte » où les bases se réorientent indépendamment. La « fusion » des polynucléotides qui se manifeste par un déplacement de la résonance du phosphore vers les bas champs provient d'une augmentation de la population du conformère *gt* du groupe phosphoester aux dépens du conformère *gg*, tous deux représentés dans la figure 4 sur l'exemple de l'UpA (uridilyl 3' → 5' adénosine monophosphate).

s'effectuent la plupart des réactions biochimiques ne se comportent pas toujours comme de simples solutions aqueuses, les surfaces des protéines enzymatiques et des biomembranes peuvent être considérées comme non hydratées et les molécules d'eau, quand elles sont présentes, participent à des structures ordonnées.

La courbe de titration du déplacement chimique en fonction du pH présente pour l'ATP en solution aqueuse un déplacement chimique important du phosphore γ à pH 6,7, moins accentué pour le

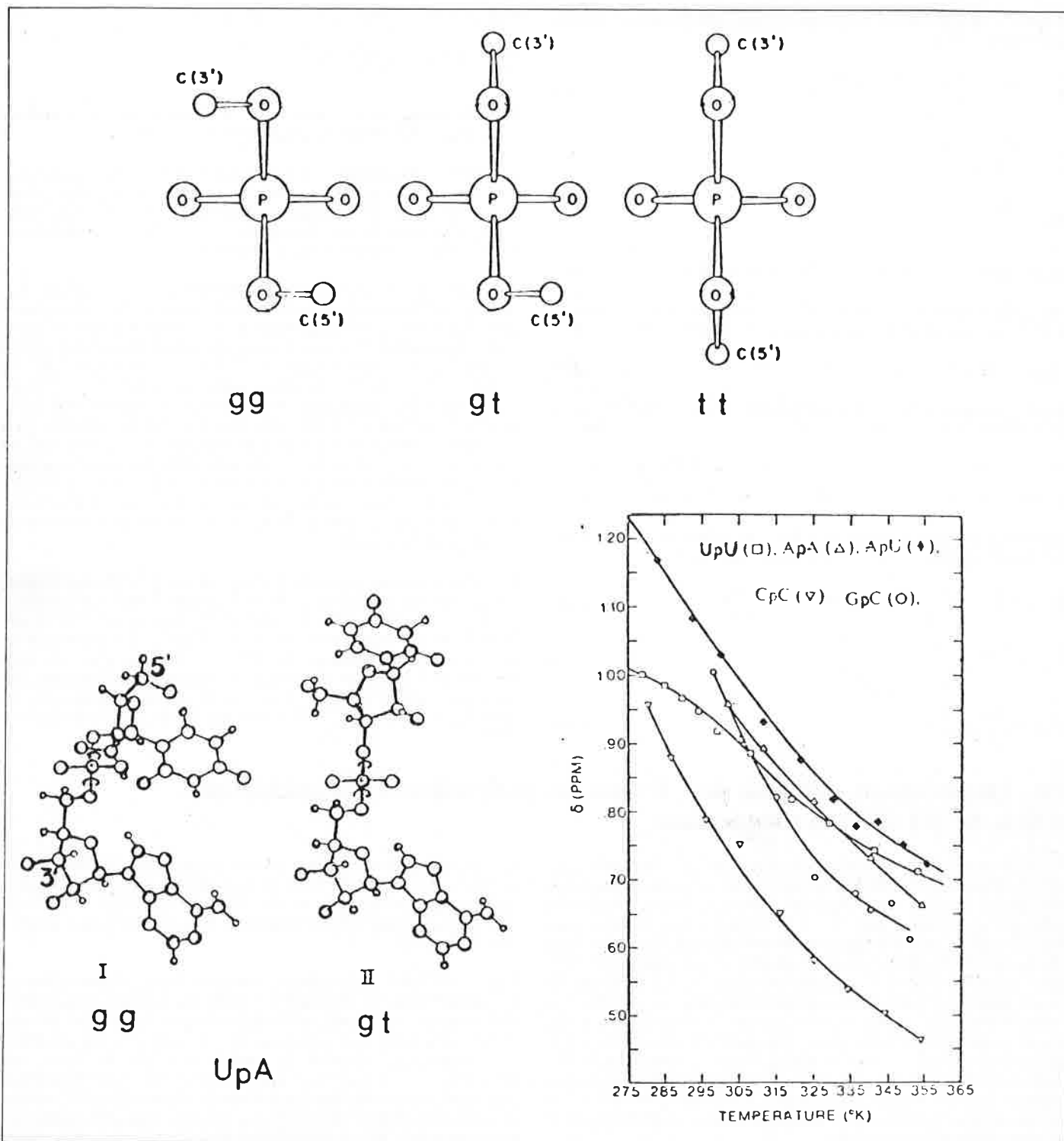


Figure 4. (A) Conformères du fragment C3'-O3'-P-O5'-C5' de dinucléotides.

(B) Conformères gg et gt de l'uridilyl 3' → 5' adénosine monophosphate.

(C) Effet de la température sur le déplacement chimique de ^{31}P dans les dinucléotides UpU, ApA, ApU, CpC, et GpC (U = uridine, A = adénine, C = cytosine, G = guanine).

(B) et (C) sont reproduits d'après la référence 12.

phosphore β et pratiquement nul pour le phosphore α . Ces déplacements chimiques correspondent à la protonation du groupe phosphate terminal. En milieu tétraméthyluréé le point d'inflexion de la courbe de titrage n'est pas observé à pH 6,7 mais à pH 4,7 ce qui correspond non plus à la protonation de la chaîne phosphate, mais à celle du cycle, sur l'azote 7. Cette variation correspond à l'interaction de la chaîne phosphate avec l'adénine chargée positivement. La comparaison des deux solvants montre qu'en solution aqueuse, la

chaîne phosphate est hydratée et éloignée de la base alors qu'en milieu polaire anhydre il se produit un changement de conformation de la chaîne phosphate qui s'oriente vers la base lorsque celle-ci est protonée. Ceci est parfaitement confirmé par l'étude du couplage ^{31}P - ^{31}P . En milieu aqueux $J_{\alpha\beta}$ et $J_{\beta\gamma}$ sont tous deux égaux à 21 Hz quel que soit le pH. En milieu anhydre de tétraméthyluréé ces deux couplages sont assez voisins et de l'ordre de 24 Hz à pH neutre ou basique. Ils divergent au-dessous de pH 6 et tendent vers les limites

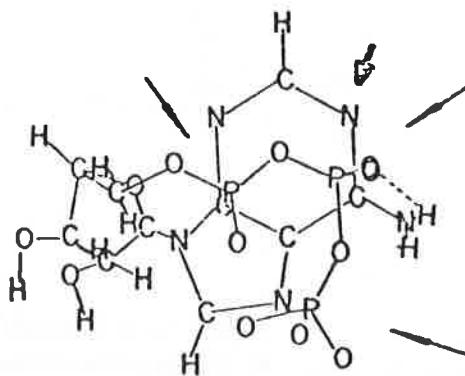
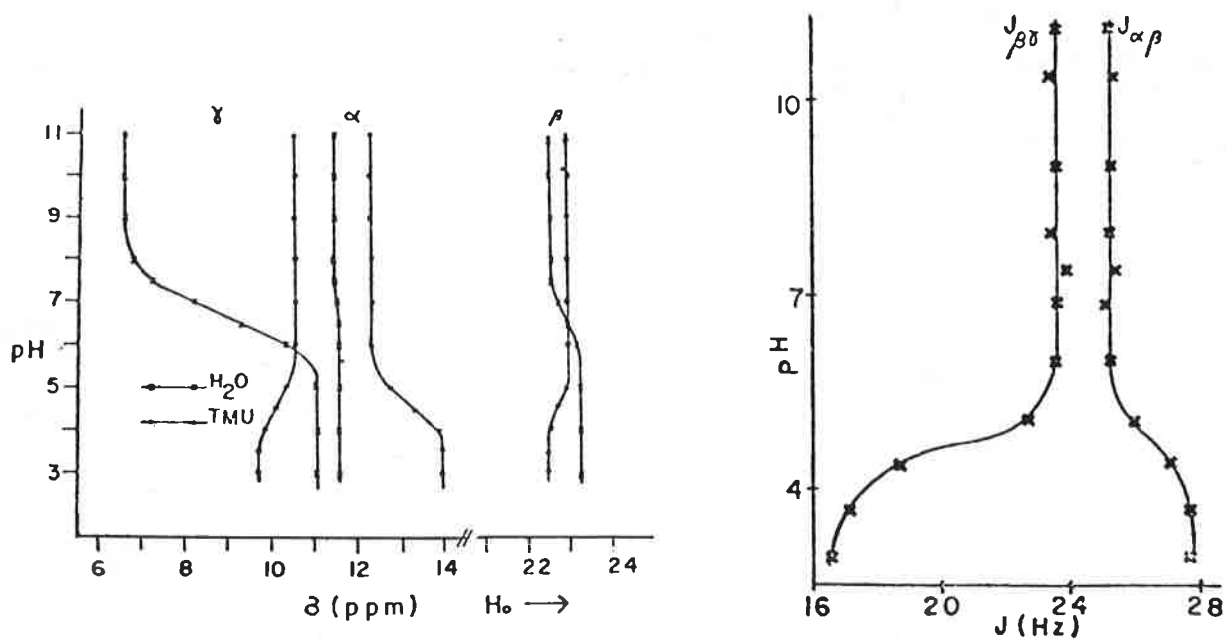
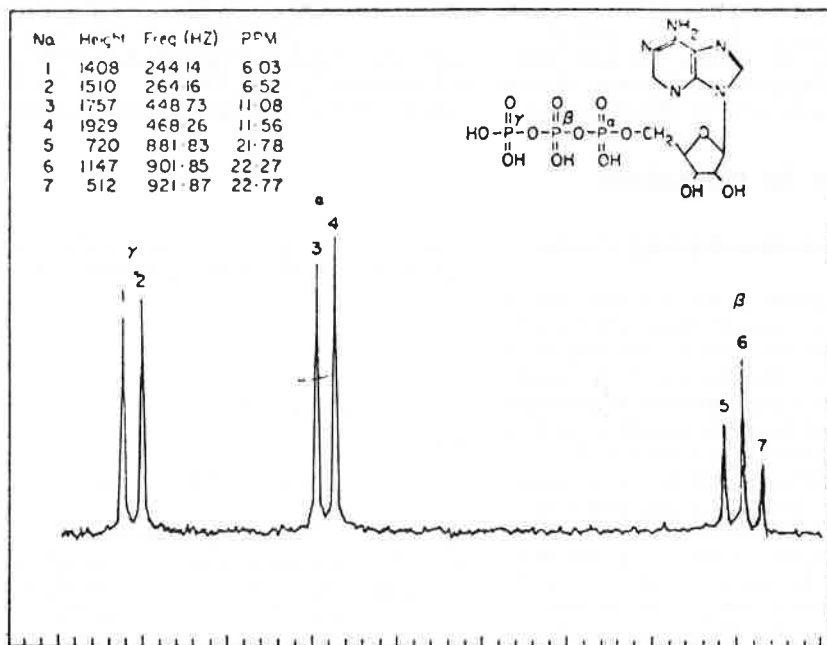


Figure 5. (A) Spectre de ^{31}P de l'adénosine triphosphate à 40 MHz ($H_0 = 23,5$ kgauss).
 (B) Déplacement chimique et couplage $^1J_{P-P}$ de l'ATP en milieux aqueux et dans la tétraméthylurée (TMU).
 (C) Conformation de l'ATP en milieu anhydre (TMU) montrant l'interaction entre le groupe triphosphate et l'adénine par liaison hydrogène.
 (B) et (C) sont extraits de la référence 13.

$J_{\alpha\beta} = 28 \text{ Hz}$ et $J_{\beta\gamma} = 16 \text{ Hz}$, le point milieu de la transition étant situé à pH 4,5 comme pour celle des déplacements chimiques. De ces changements de déplacement chimique et de couplage phosphore-phosphore dans la tétraméthylurée les auteurs déduisent qu'en milieu acide anhydre, la chaîne de phosphate se replie sur l'adénine avec formation d'une liaison hydrogène entre la phosphate β et le

groupe amino en position 6 de la base (Figure 5). Une observation analogue a été faite sur la résonance du ^{31}P dans un muscle intact de grenouille. Lorsque le muscle est frais les couplages $J_{\alpha\beta}$ et $J_{\beta\gamma}$ sont équivalents, lorsqu'il se dégrade et s'acidifie, ces couplages divergent et l'on obtient $J_{\alpha\beta} = 22,8 \text{ Hz}$, $J_{\beta\gamma} = 14,8 \text{ Hz}$. Cela indique que dans le muscle l'ATP est en milieu anhydre ou en milieu aqueux structuré.

V. Relaxation nucléaire du phosphore

V.1. Relaxation de ^{31}P en milieu diamagnétique

Le déplacement chimique du phosphore et son couplage avec le proton ou le carbone 13 ne donnent que des informations très locales sur les composés biologiques phosphorés. Des informations sur la structure moléculaire à plus grande échelle ainsi que sur la dynamique moléculaire peuvent être fournies par les méthodes de relaxation nucléaire : c'est-à-dire la mesure des temps de relaxation T_1 et T_2 et de l'effet Overhauser nucléaire. Les temps de relaxation T_1 et T_2 définissent la vitesse de retour à l'équilibre de l'aimantation nucléaire après une perturbation telle qu'une impulsion radiofréquence intense. L'effet Overhauser nucléaire est la variation d'amplitude du signal de résonance d'un noyau que l'on observe lorsqu'on sature simultanément la résonance d'un autre noyau qui exerce sur lui un effet dipolaire. Dans le cas des systèmes biologiques la relaxation du phosphore s'effectue par interaction dipolaire avec les protons avoisinants et par anisotropie du déplacement chimique. La séparation de ces deux contributions peut être effectuée soit par des expériences de relaxation à des champs différents, la relaxation par anisotropie de déplacement chimique augmentant comme le carré du champ, ou plus simplement par mesure de l'effet Overhauser.

La vitesse de relaxation longitudinale du phosphore, que l'on obtient généralement avec une meilleure précision que le temps de relaxation T_2 ou l'effet Overhauser, a pour expression :

$$\frac{1}{T_1} = \left[\frac{1}{T_1} \right]_{\text{dipole}} + \left[\frac{1}{T_1} \right]_{\text{csa}} = \sum_i \rho_{\text{H}_i} + \rho_{\text{P}} \quad (\text{VIII})$$

avec :

$$\rho_{\text{PH}_i} = \frac{\gamma_{\text{P}}^2 \gamma_{\text{H}}^2 \hbar^2}{r_i^6} \times \frac{\tau_c}{10} \left[\frac{1}{1 + (\omega_{\text{P}} - \omega_{\text{H}})^2 \tau_c^2} + \frac{6}{1 + (\omega_{\text{P}} + \omega_{\text{H}})^2 \tau_c^2} + \frac{3}{1 + \omega_{\text{P}}^2 \tau_c^2} \right] \quad (\text{IXa})$$

$$\rho_{\text{P}} = \frac{2}{15} (\delta_{\parallel} - \delta_{\perp})^2 \omega_{\text{P}}^2 \times \frac{\tau_c}{1 + \omega_{\text{P}}^2 \tau_c^2} \quad (\text{IXb})$$

La relation VIII n'est valable que pour un découplage complet des protons. Dans ces conditions l'intensité intégrée du signal de ^{31}P s'accroît d'un facteur $1 + \eta$ par rapport au signal observé sans découplage de ^1H (effet Overhauser) avec :

$$\eta = \frac{\sum_i \sigma_{\text{PH}_i}}{\sum_i \rho_{\text{H}_i} + \rho_{\text{P}}} \times \frac{\gamma_{\text{H}}}{\gamma_{\text{P}}} = \frac{2,47 \sum_i \sigma_{\text{PH}_i}}{\sum_i \rho_{\text{PH}_i} + \rho_{\text{P}}} \quad (\text{Xa})$$

$$\sigma_{\text{PH}_i} = \frac{\gamma_{\text{P}}^2 \gamma_{\text{H}}^2 \hbar^2}{10 r_i^6} \tau_c \left[-\frac{1}{1 + (\omega_{\text{P}} - \omega_{\text{H}})^2 \tau_c^2} + \frac{6}{(\omega_{\text{P}} + \omega_{\text{H}})^2 \tau_c^2} \right] \quad (\text{Xb})$$

Dans ces expressions $\omega_{\text{H,P}}$ désigne la fréquence de Larmor du proton ou de phosphore dont les rapports gyromagnétiques sont désignés par $\gamma_{\text{H,P}}$. r_i est la distance du phosphore à un proton i , τ_c le temps de corrélation caractéristique du mouvement de réorientation supposé isotrope de la molécule. δ_{\parallel} et δ_{\perp} sont les composantes principales du tenseur de déplacement chimique du phosphore exprimées en ppm. Dans le cas où le champ magnétique est peu élevé et où les mouvements moléculaires sont suffisamment

rapides [$(\omega_{\text{P}} + \omega_{\text{H}})^2 \tau_c^2 \ll 1$] les expressions de la vitesse de relaxation et de l'accroissement Overhauser se simplifient notablement :

$$\frac{1}{T_1} = (A + B) \tau_c \quad (\text{XI})$$

$$\eta = 1,235 \frac{A}{A + B} \quad (\text{XII})$$

avec

$$A = \sum_i \gamma_{\text{P}}^2 \gamma_{\text{H}}^2 \hbar^2 r_i^{-6} \quad \text{et} \quad B = \frac{2}{15} \omega_{\text{P}}^2 (\delta_{\parallel} - \delta)^2$$

Les relations IX et X sont valables par exemple pour les nucléotides et l'ATP en solution aqueuse à température ordinaire, dans un champ magnétique $H_0 \leq 23,5 \text{ kgauss}$. Dans ces conditions, dites de « rétrécissement extrême », l'accroissement Overhauser de la résonance du phosphore atteint sa valeur maximale de 124 % si la relaxation de ce noyau est d'origine exclusivement dipolaire.

Un exemple intéressant d'application de l'effet Overhauser phosphore-proton est l'étude de Yeagle et coll. (14) sur la conformation des groupes polaires des phospholipides et leurs interactions intermoléculaires. L'effet Overhauser est mesuré par les variations d'amplitude du signal du phosphore d'une double couche de phosphatidyle-choline :

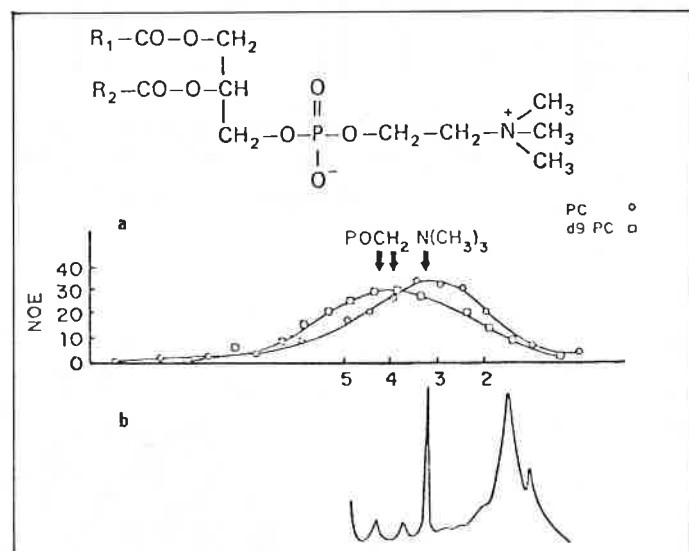
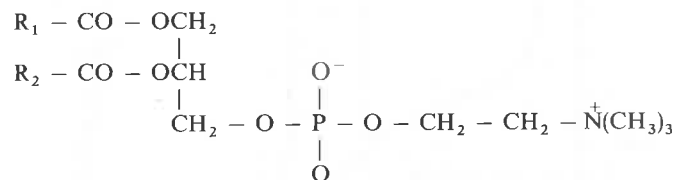


Figure 6. (A) Formule de la phosphatidyle choline, R_1 et R_2 désignant les longues chaînes alkyles.

(B) a) Accroissement Overhauser η (NOE) de ^{31}P en fonction de la fréquence de découplage des protons exprimée en ppm par rapport au tétraméthylsilane. POCH₂ désigne les groupes méthylènes adjacents au phosphate.

b) Spectre de résonance protonique de vésicules de phosphatidylecholine.

Ces deux diagrammes sont extraits de la référence 14.

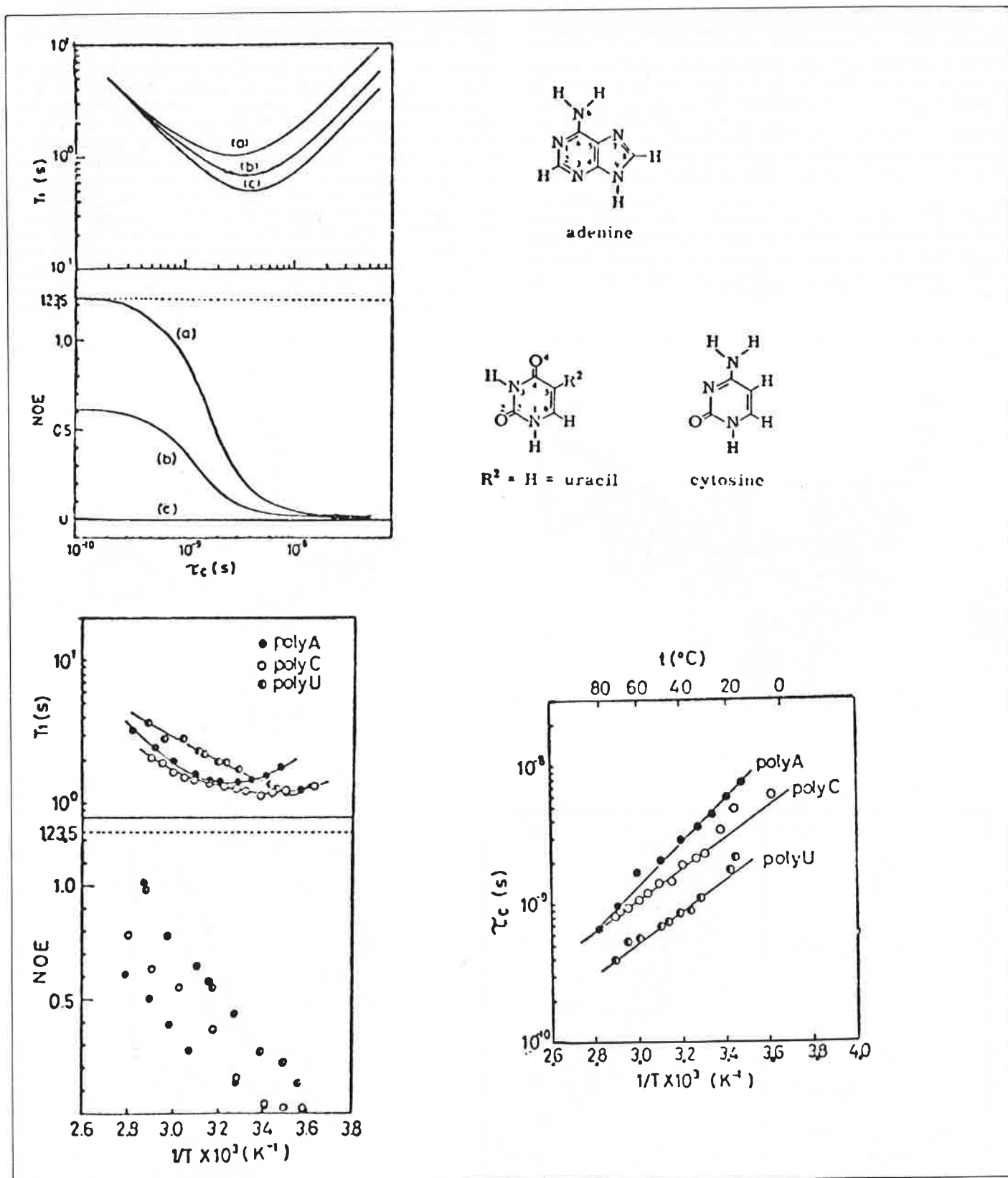


Figure 7. (A) Courbes théoriques de T_1 et de l'accroissement Overhauser (NOE) de ^{31}P en fonction de τ_c , relations (8)-(10) pour $H_0 = 23,5$ kgauss.

a) Relaxation purement dipolaire.

b) Contributions égales de la relaxation dipolaire et de la relaxation par anisotropie du déplacement chimique.

c) Contribution exclusive de l'anisotropie du déplacement chimique.

(B) Valeurs expérimentales de T_1 et de η (NOE) dans les polynucléotides en fonction de la température pour $H_0 = 23,5$ kgauss.

(C) Temps de corrélation calculés à partir de (B).

Les diagrammes (A), (B) et (C) sont extraits de la référence 15.

en faisant varier linéairement la fréquence d'irradiation des protons. L'accroissement Overhauser de la résonance du phosphore, que l'on détermine ainsi, est inversement proportionnelle à la puissance sixième de la distance proton-phosphore. Cette expérience indique que les protons des méthyles liés à l'azote sont plus proches du phosphore que ceux des méthylènes liés au groupe phosphate. Lorsqu'on remplace en effet des protons méthyliques par des deutérons, le maximum de l'effet Overhauser se déplace de la fréquence des groupes méthyles à celle des méthylènes.

On montre par ailleurs que les groupes cholines s'orientent parallèlement à la double couche de phospholipide et que le groupe $\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$ interagit avec le phosphate d'une molécule voisine. Si l'on remplace en effet la moitié des molécules de phosphatidyle-choline par celles de phosphatidyle-éthanolamine, on observe l'accroissement Overhauser $^{31}\text{P}\{-^1\text{H}\}$ pour ces dernières lorsqu'on irradie les protons du groupe $(\text{CH}_3)_3$ de la phosphatidyle-choline.

L'effet Overhauser $^{31}\text{P}\{-^1\text{H}\}$ et la relaxation longitudinale du phosphore ont été appliqués par Akasaka et coll. (15) à l'étude des polyribonucléotides : acides polyribouridilique, adénylique et cytidylique (poly U, poly A et poly C) en solution aqueuse neutre. L'accroissement Overhauser de la résonance du phosphore, lorsqu'on découple les protons, indique que la relaxation de ce noyau provient en majeure partie de l'interaction dipolaire $^1\text{H}\text{-}^{31}\text{P}$ (relation X). Les contributions individuelles des protons qui entourent le groupe phosphate ne peuvent être déterminées mais on peut déduire des valeurs minimales de T_1 une distance P-H effective telle que $r_{\text{eff}} = (\sum r_i^6)^{1/6}$. Pour les trois polynucléotides étudiés, l'interaction dipolaire d'un phosphore avec les protons de la macromolécule peut être assimilée à celle qu'exercerait un seul proton à une distance d'environ 2,5 Å. Cela indique en particulier que la conformation locale au voisinage du groupe phosphate est à peu près la même pour les trois polymères en question. Le minimum du temps de relaxation T_1 , qui correspond à $\tau_c = 4 \times 10^{-9}$ s pour $H_0 = 23,5$ gauss,

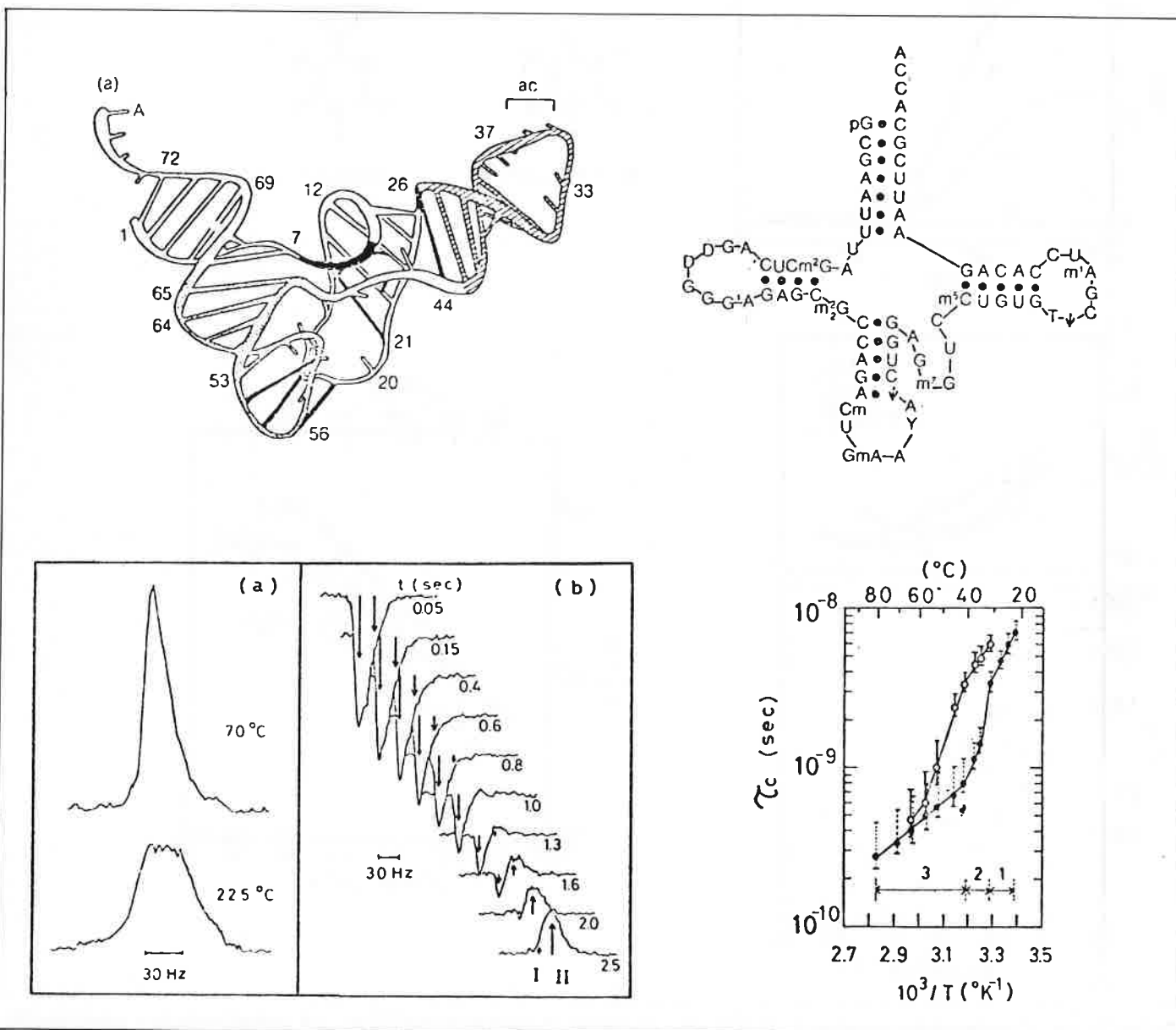


Figure 8. (A) Représentation pliée de l'ARNt de la phénylalanine (structure ternaire).

(B) Représentation plane « en trèfle » de l'ARNt.

(C) a) Résonance de ^{31}P de l'ARNt.

b) Mesure du T_1 de ^{31}P par inversion récupération, les temps séparant les impulsions de 180° et de 90° sont indiqués à côté de chaque spectre.

(D) Temps de corrélation de réorientation τ_c des groupes phosphates en fonction de $1/T$:

(●) domaines non hélicoïdaux,

(○) domaines en hélice à double brins.

Les diagrammes (C) et (D) sont extraits de la référence 16.

se situe à une température d'autant plus basse que la macromolécule est moins rigide. On observe ainsi que la rigidité croît dans l'ordre poly U < poly C < poly A comme le confirme l'effet Overhauser. L'énergie d'activation des mouvements segmentaires de ces macromolécules, donnée par la variation de T_1 en fonction de $1/T$, croît dans le même ordre, qui reflète une tendance croissante à l'association entre les bases des unités monomères et donc à une moindre flexibilité.

Selon les mêmes principes, la relaxation du phosphore a été appliquée par Akasaka et coll. (16) à l'étude de la dénaturation de l'acide ribonucléique de transfert (ARNt) de la phénylalanine. Le spectre RMN du phosphore de cette macromolécule comporte deux raies presque confondues à la fréquence de 40 MHz. Leur différenciation peut être effectuée par une expérience d'inversion récupération (séquences d'impulsion 180° , t , 90° en transformée de Fourier) mettant à profit des temps de relaxation très différents.

La raie de résonance située à plus haut champ correspond aux domaines en double hélice de l'ARNt, où les bases des nucléotides sont associées par paires, l'autre, aux domaines non hélicoïdaux moins rigides. L'analyse de la variation avec la température du temps de relaxation T_1 du phosphore et de l'effet Overhauser $^{31}\text{P}\text{-}\{^1\text{H}\}$ permet de mettre en évidence les étapes de la dénaturation de l'ARNt. Cette dénaturation se manifeste par un accroissement de la mobilité segmentaire de la macromolécule :

- de 20 à 30 °C l'ARNt existe sous sa forme normale avec une structure globale pliée (structure ternaire) (Figure 8). On observe alors les deux pics mentionnés plus haut.
- entre 30 et 40 °C se produit une transition abrupte qui entraîne une décroissance rapide du temps de corrélation τ_c des mouvements segmentaires des domaines non hélicoïdaux de l'ARNt. Cette transition est attribuable à la disparition de la structure ternaire de la macromolécule.
- au-dessus de 40 °C on observe une coalescence progressive des deux résonances du phosphore, due à la disparition des domaines en double hélice (structure secondaire de l'ARNt).

V.2. Relaxation paramagnétique de ^{31}P Application aux complexes ATP-ions divalents

Une autre application importante de la relaxation du phosphore est l'étude des complexes de molécules biologiques avec les ions métalliques, en particulier ceux de l'ATP avec les ions divalents qui sont des activateurs de réactions enzymatiques. Parmi les nombreux travaux dans ce domaine, nous citerons celui de Sternlicht, Shulman et Anderson (17) qui ont étudié les complexes de l'ATP avec les ions Mn^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} et Cu^{2+} en fonction de la température, du pH et de la concentration de ces ions. Nous nous limiterons au cas le plus simple du complexe $\text{ATP}\text{-Mn}^{2+}$. Les vitesses de relaxation nucléaires longitudinales ($T_{1\text{P}}^{-1}$) et transversales ($T_{2\text{P}}^{-1}$), induites par un ion paramagnétique, sont données par les expressions (simplifiées) (18) :

$$T_{1\text{P}}^{-1} = \frac{2}{5} S(S+1) (\gamma_S \gamma_P \hbar)^2 r^{-6} \tau_c \quad (\text{XIII})$$

$$T_{2\text{P}}^{-1} = \pi \Delta\nu_{1/2} = \frac{7}{15} S(S+1) (\gamma_S \gamma_P \hbar)^2 r^{-6} \tau_c + \frac{1}{3} S(S+1) A^2 T_{1e} \quad (\text{XIV})$$

VI. ^{31}P dans les cellules et les tissus intacts

Une application récente de la résonance nucléaire du phosphore en biologie est l'étude des cellules et tissus intacts. A cet égard le phosphore est privilégié par rapport à d'autres noyaux tels que le proton et le carbone 13, car il donne des spectres relativement simples et facilement identifiables, correspondant à un nombre limité de composés.

C'est ainsi qu'en 1974, Radda et coll. (21) ont montré que le spectre de RMN du phosphore dans un muscle intact peut être obtenu en quelques minutes par accumulation en transformée de Fourier. Ce

S est le spin électronique total de l'ion, γ_S et γ_P sont les rapports gyromagnétiques de l'électron et du phosphore, r la distance phosphore-ion métallique. τ_c est un temps de corrélation défini par $\tau_c^{-1} = T_{1e}^{-1} + \tau_R^{-1}$, T_{1e} étant le temps de relaxation longitudinale de l'électron et τ_R le temps de corrélation de réorientation du complexe. Dans le cas du complexe $\text{Mn}^{2+}\text{-ATP}$, τ_c est pratiquement égal à τ_R . A désigne la constante de couplage hyperfin du phosphore (exprimée en radians $\cdot \text{s}^{-1}$) proportionnelle à la densité de spin dans l'orbitale $2s$ de ce noyau. Cette constante est en général donnée par le déplacement de contact de la résonance d'un noyau en présence d'un ion paramagnétique.

A température ambiante, les temps de relaxation longitudinale des trois phosphores de l'ATP sont à peu près équivalents avec $T_{1\text{P}} \sim T_{1\beta} \sim 0,75 T_{1\alpha}$, ce qui implique que l'ion Mn^{2+} est presque équidistant des trois groupes phosphates. On sait par ailleurs que la distance $\text{Mn}^{2+}\text{-P}$ dans les phosphates de manganèse est de 3,3 Å et l'on en déduit un temps de corrélation τ_R de l'ordre de 10^{-9} s pour le complexe $\text{ATP}\text{-Mn}^{2+}$ en solution aqueuse (relation XIII). La grande différence entre les vitesses de relaxation $T_{1\text{P}}^{-1}$ et $T_{2\text{P}}^{-1}$ des phosphores indique que la contribution scalaire à $T_{2\text{P}}^{-1}$ est prédominante. La largeur de raie $\Delta\nu_{1/2}$ quasi-équivalente des trois phosphores correspond à un couplage hyperfin de $1,5$ à $2 \cdot 10^7$ radians $\cdot \text{s}^{-1}$. La position de Mn^{2+} par rapport au groupe triphosphate étant connue, la géométrie globale du complexe a été déterminée à l'aide de mesures complémentaires de relaxation protonique. En appliquant les relations XIII et XIV à la relaxation des protons H8, H2 et H1' de l'ATP, on déduit que l'ion manganèse est lié également à la base adénine par l'azote N7 (Figure 9).

Cette méthode d'analyse conformationnelle mettant en œuvre des ions paramagnétiques est fréquemment appliquée à l'élucidation des conformations de composés biologiques beaucoup plus complexes que l'ATP ainsi que de macromolécules (voir par exemple réf. 20).

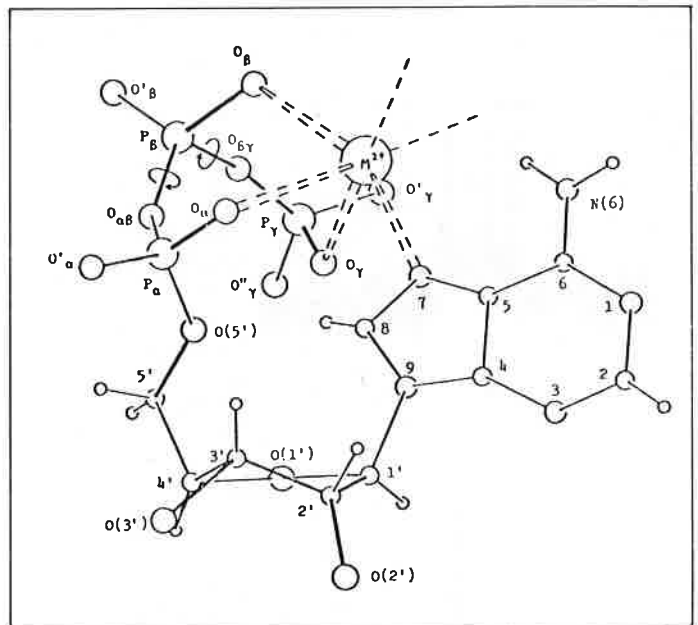
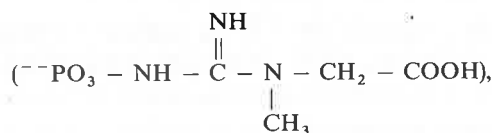


Figure 9. Complexe de l'ATP avec un ion métallique divalent M^{2+} (d'après la référence 19).

spectre est constitué des signaux de l'ATP, du phosphate de créatine



des phosphates de glucose et des ions phosphate minéraux. La position des pics de l'ATP indique que ce composé est en grande

partie complexé par un ion divalent, probablement le magnésium. Le déplacement chimique de l'ion phosphate donne par ailleurs une mesure du pH intracellulaire. On constate ainsi qu'un défaut d'oxygénation du tissu entraîne une diminution du pH par suite de la libération d'acide lactique par glycolyse. Radda et coll. (22, 23) ont également effectué des expériences de RMN du phosphore sur le muscle cardiaque de souris maintenu en activité dans la sonde du spectromètre par perfusion. Les mesures ont été effectuées à 37 °C, dans un champ magnétique de 76 kgauss à une fréquence de 129 MHz.

Le premier spectre de la figure 10 correspond à l'état stationnaire en

cours de perfusion : on distingue les trois résonances de l'ATP, ainsi que deux pics correspondant respectivement au phosphate de créatine et à l'ion phosphate. Les spectres (a) à (d) ont été successivement enregistrés pendant des intervalles de temps de 200 secondes après arrêt de la perfusion. On note une décroissance rapide du phosphate de créatine, une disparition plus lente de l'ATP et un déplacement de la résonance de l'ion phosphate vers les hauts champs, lié à une diminution de pH. Lorsque la perfusion est reprise (spectres A et B), on observe une réapparition rapide du phosphate de créatine et une augmentation plus lente de la concentration de l'ATP. Ce type d'expérience peut être effectué sur n'importe quel organe maintenu en activité par perfusion, après prélèvement.

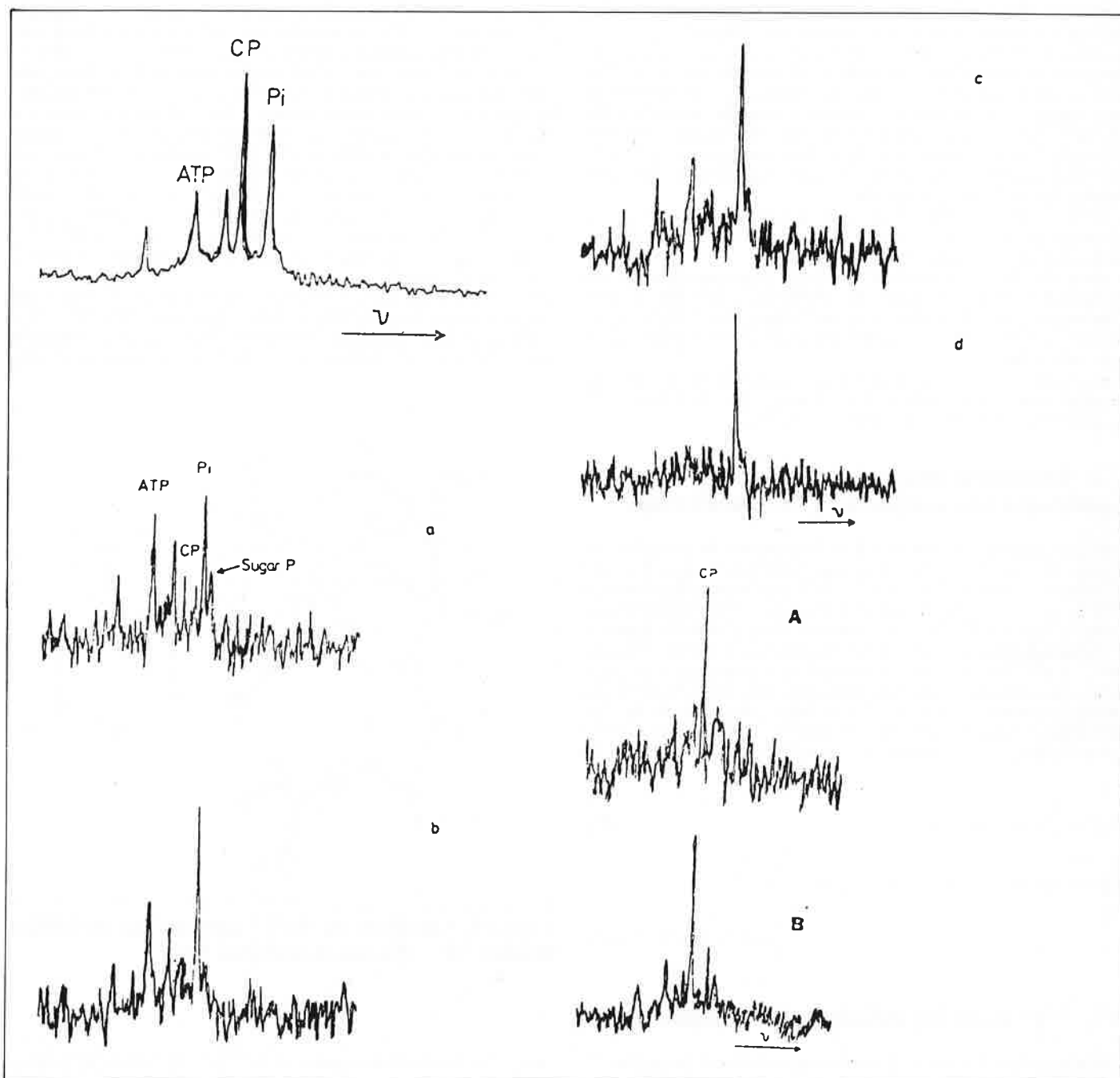


Figure 10. En haut : spectre de ^{31}P du muscle cardiaque de souris (fréquence 129 MHz, $T = 37^\circ\text{C}$) en état stationnaire sous perfusion. ATP : adénosine triphosphate ; CP : phosphate de créatine ; P_i = ions phosphate.

Les spectres (a), (b), (c) et (d) sont obtenus en transformée de Fourier par périodes de 200 secondes après arrêt de la perfusion.

(A) Spectre obtenu immédiatement après reprise de la perfusion.

(B) Quinze minutes après.

Ces spectres sont extraits de la référence 23.

VII. Conclusion

Ces quelques exemples montrent la diversité des informations que donne la RMN du phosphore sur les conformations de certaines molécules biologiques et leur évolution en fonction de facteurs tels que le pH ou la température.

Parmi ces informations, les plus précises sont fournies par les couplages du phosphore avec le proton ou le carbone 13, mais elles concernent essentiellement les petites molécules pour lesquelles la résolution spectrale est suffisante. Pour les molécules biologiques complexes et les macromolécules, on se réfère le plus souvent au déplacement chimique du phosphore dont la théorie est loin d'être parfaitement établie, mais qui donne des informations importantes quoique essentiellement qualitatives.

La relaxation nucléaire du phosphore s'applique à la dynamique

moléculaire plutôt qu'à l'étude de conformation, sauf dans les cas où l'on peut utiliser des ions métalliques comme sonde paramagnétique. Elle nécessite généralement des études complémentaires de relaxation du proton ou du carbone 13.

Enfin, par rapport aux autres noyaux, la RMN du phosphore a l'avantage presque exclusif de se prêter à l'étude de systèmes biologiques complexes tels que des cellules ou des tissus intacts et l'on peut s'attendre à des progrès importants dans ce domaine.

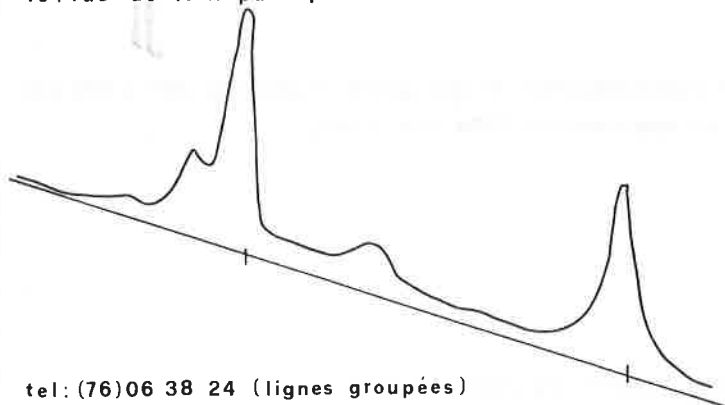
Les figures extraites de références citées dans les légendes ont été reproduites avec l'autorisation des éditeurs que nous remercions ici : American Chemical Society (12, 13, 14), The Chemical Society of Japan (2, 15), Academic Press Inc. (23), John Wiley and Sons (16, 19).

Bibliographie

- (1) G. Mavel, *Ann. Report NMR Spectroscopy*, 1973, **5B**, 1.
- (2) M. Tsuboi, F. Kuriyagawa, K. Matsuo et Y. Kyogoku, *Bull. Chem. Soc. Japan*, 1967, **40**, 1813.
- (3) D. W. White et J. G. Verkade, *J. Mag. Res.*, 1970, **3**, 111.
- (4) B. J. Blackburn, R. D. Lapper et I. C. P. Smith, *J. Amer. Chem. Soc.*, 1973, **95**, 2873.
- (5) R. D. Lapper, H. H. Mantsch et I. C. P. Smith, *J. Amer. Chem. Soc.*, 1973, **95**, 2878.
- (6) D. B. Davies et S. S. Danyluk, *Biochemistry*, 1975, **14**, 543.
- (7) D. B. Davies et S. S. Danyluk, *Biochemistry*, 1974, **13**, 4417.
- (8) N. S. Kondo et S. S. Danyluk, *Biochemistry*, 1976, **15**, 756.
- (9) P. J. Cozzone et O. Jardetzky, *Biochemistry*, 1976, **15**, 4860.
- (10) P. J. Cozzone et O. Jardetzky, *Biochemistry*, 1976, **15**, 4853.
- (11) D. G. Gorenstein, *J. Amer. Chem. Soc.*, 1975, **97**, 898.
- (12) D. G. Gorenstein, J. B. Findlay, R. K. Momi, B. A. Luxon et D. Kar, *Biochemistry*, 1976, **15**, 3796.
- (13) R. J. Labotka, T. Glonek et T. C. Myers, *J. Amer. Chem. Soc.*, 1976, **98**, 3699.
- (14) P. L. Yeagle, W. C. Hutton, Chin-Hsien Huang et R. B. Martin, *Biochemistry*, 1977, **16**, 4344.
- (15) K. Akasaka, A. Yamada et H. Hatano, *Bull. Chem. Soc. Japan*, 1977, **50**, 2858.
- (16) F. Hayashi, K. Akasaka et H. Hatano, *Biopolymers*, 1977, **16**, 655.
- (17) H. Sternlicht, R. G. Shulman et E. W. Anderson, *J. Chem. Phys.*, 1965, **43**, 3123.
- (18) N. Bloembergen et L. O. Morgan, *J. Chem. Phys.*, 1961, **34**, 842.
- (19) M. Sundaralingam, *Biopolymers*, 1969, **7**, 821.
- (20) R. A. Dwek, *Nuclear Magnetic Resonance in Biochemistry*, Chapitre X, Clarendon Press, Oxford, 1973.
- (21) D. U. Hoult, S. J. W. Busby, D. G. Gadian, G. K. Radda, R. E. Richards et P. G. Seeley, *Nature*, 1974, **252**, 285.
- (22) P. B. Garlick, G. K. Radda, P. J. Seeley et B. Chance, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 1977, **74**, 1256.
- (23) M. K. Battersby, P. B. Garlick, P. J. Seeley, P. A. Sehr et G. A. Radda, dans « *Biomolecular Structure and Function* », p. 175-205, édité par P. F. Agris, Academic Press, New York, 1978.

THERMA_{analyse}

49, rue de la République 38430 MOIRANS



tel: (76)06 38 24 (lignes groupées)

analyseurs thermiques
microcalorimètres A-T-D

températures de transition

enthalpies de transition

cinétiques de réaction

regulateurs de température

programmateurs "

mesures "

microanalyseurs
gaz liquides solides...