

Changer la mise au point

Expériences de RMN biomoléculaire à très basse ou très haute résolution

Fabien Ferrage

Résumé

La résonance magnétique nucléaire est un outil de choix pour l'étude des macromolécules biologiques. De nombreuses méthodes sont utilisées quotidiennement pour caractériser la structure et la dynamique de ces biomolécules. Cet article présente deux approches méthodologiques : la première, à haute résolution, consiste à extraire sélectivement une information dans une macromolécule. À cet effet, une nouvelle technique de transfert de polarisation a été développée. La seconde, à basse résolution, est destinée à la mesure du coefficient de diffusion translationnelle d'une macromolécule ou d'un édifice supramoléculaire afin d'accéder à sa taille, même en l'absence de signaux résolus. Après une présentation des concepts employés dans ces expériences, celles-ci sont introduites et illustrées par des applications à plusieurs protéines.

Mots-clés

Résonance magnétique nucléaire (RMN), protéines, structure, diffusion.

Abstract

Changing the lens: biomolecular NMR experiments at very low and very high resolution

Nuclear magnetic resonance is a versatile tool to study biological macromolecules. Several methods are commonly used to characterize the structure and dynamics of biomolecules. Two methodological approaches are reviewed in this paper: the first one, at high resolution, makes it possible to access selectively particular information in a macromolecule. This method is based on the development of a new polarization transfer technique. The second method, at low resolution, is designed to measure the translational diffusion coefficient of a macromolecule or a supramolecular object in order to evaluate its size, even in the presence of poorly resolved spectra. After an introduction of useful concepts, the two methods are presented and illustrated by applications to various proteins.

Keywords

Nuclear magnetic resonance (NMR), proteins, structure, diffusion.

Les avancées de la biologie moléculaire et cellulaire sont fascinantes ; on découvre chaque jour de nouveaux mécanismes qui permettent de faire le lien entre les manifestations macroscopiques du vivant – fonction et développement des organes, maladies infectieuses, transfert d'information – et leurs vecteurs microscopiques – interactions entre biomolécules, biosynthèse, changements de phase d'un milieu, de conformation d'une molécule. Les outils spectroscopiques du physico-chimiste sont indispensables à une compréhension plus détaillée, à une échelle sub-moléculaire, des phénomènes mis en jeu : comment deux molécules interagissent-elles ? Quelle est leur conformation ? Quelle est la (thermo)dynamique du processus ? Parmi les outils disponibles, la résonance magnétique nucléaire (RMN) est une méthode de choix. Nous introduirons quelques concepts dans la première partie de cet article.

L'un des atouts de la RMN est de fournir une information locale, à l'échelle de l'atome. Pour cela, de nombreuses méthodes ont été développées afin d'apporter des informations structurales ou dynamiques pour l'étude d'un édifice biomoléculaire [1]. Ces expériences fournissent une information locale pour l'ensemble de la molécule étudiée. La contrepartie est que cette information ne peut être ni extrêmement précise, ni de qualité uniforme. Ainsi, lorsqu'il est nécessaire de mieux connaître la structure d'un site actif ou d'une zone d'interaction, ou de mieux définir une propriété dynamique locale, de nombreuses méthodes de RMN ne sont plus nécessairement adéquates. C'est pourquoi nous avons développé, afin de pouvoir extraire une information donnée,

une nouvelle approche pour la conception d'expériences sélectives vis-à-vis des déplacements chimiques. Ces méthodes seront exposées dans la seconde partie.

Si l'utilisation de méthodes sélectives peut être considérée comme étant en aval de l'étude traditionnelle d'une biomolécule, la recherche d'informations à basse résolution (recherche de conditions de solubilisation, de l'existence d'une interaction, etc.) intervient en amont d'une telle approche. En particulier, la connaissance de la taille d'un objet biologique peut être une information requise au préalable, soit lorsqu'il s'agit de caractériser cet objet, soit lorsqu'il est associé à d'autres biomolécules. Même si ses spectres ne permettent pas une étude locale, la RMN peut fournir des informations sur les propriétés physico-chimiques d'un objet biologique, telle la taille, en mesurant le coefficient de diffusion d'un objet moléculaire même s'il n'est pas seul en solution [2]. Nous avons développé une méthode de RMN qui permet de caractériser la diffusion d'objets de grande taille en ayant accès à des échelles de temps plus longues. Cette méthode sera exposée dans la troisième partie de cet article.

Quelques concepts

Cette première partie est destinée à introduire quelques concepts fondamentaux. Pour une introduction plus générale et complète des concepts de la RMN, nous conseillons notamment la consultation des ouvrages de Malcolm H. Levitt [3] et James Keeler [4] ou de celui (plus mathématique) de Maurice Goldman [5].

Interactions dans un système de deux spins 1/2

Il est possible de classer les interactions traitées ici en deux catégories. La première est celle des interactions externes, telle l'interaction Zeeman (figure 1a), avec le champ statique du spectromètre, et celle avec les champs radiofréquence (figure 1b). La première entraîne un mouvement de précession autour du champ B_0 , de pulsation $\omega_0 = -\gamma B_0$, où γ est le rapport gyromagnétique du noyau. Le mouvement additionnel de rotation autour du champ radiofréquence est appelé *nutaton*, sa pulsation est $\omega_1 = -\gamma B_1$.

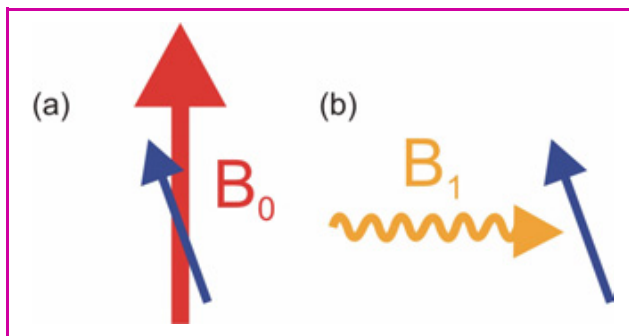


Figure 1 - Interactions externes d'un spin 1/2 (flèche bleue) : (a) avec le champ statique B_0 , flèche rouge, et (b) avec un champ radiofréquence B_1 (RF), flèche ondulée orange.

La seconde catégorie est celle des interactions internes : déplacement chimique et couplage. Le déplacement chimique est dû à la perturbation du champ statique par l'environnement électronique du noyau. Cette interaction dépend de l'orientation de la molécule, mais elle est habituellement séparée en deux parties : le déplacement chimique moyen, dit isotrope, qui est ajouté à l'interaction Zeeman (figure 2a), et le déplacement chimique dit anisotrope, de valeur moyenne nulle (figure 2b). Deux mécanismes contribuent au couplage entre deux spins : le couplage direct (figure 2d), à travers l'espace, qui dépend de l'orientation et dont la valeur moyenne est nulle, et le couplage scalaire (figure 2c), via les électrons, qui n'est pas moyenné à zéro. En général, les déplacements chimiques isotropes et couplages scalaires sont observés directement sur les spectres de RMN en phase liquide, alors que les deux interactions plus intenses mais de valeur moyenne nulle (déplacement chimique anisotrope et

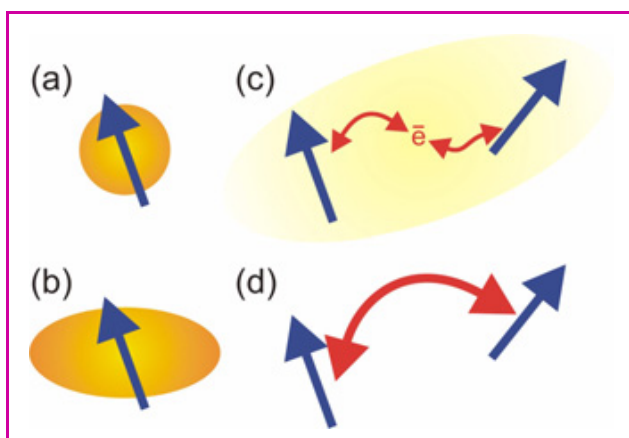


Figure 2 - Interactions internes pour deux spins 1/2 : (a) déplacement chimique isotrope, (b) déplacement chimique anisotrope, (c) couplage scalaire via les électrons et (d) couplage dipolaire à travers l'espace.

couplage dipolaire) ne sont observées qu'indirectement comme mécanisme de relaxation (*vide infra*).

Lorsqu'il existe un couplage scalaire entre deux noyaux, les niveaux d'énergie sont perturbés. Le spectre de RMN est ainsi modifié et chaque pic affiche une structure de doublet (figure 3). Chaque composante du doublet correspond au signal d'une *transition unique*.

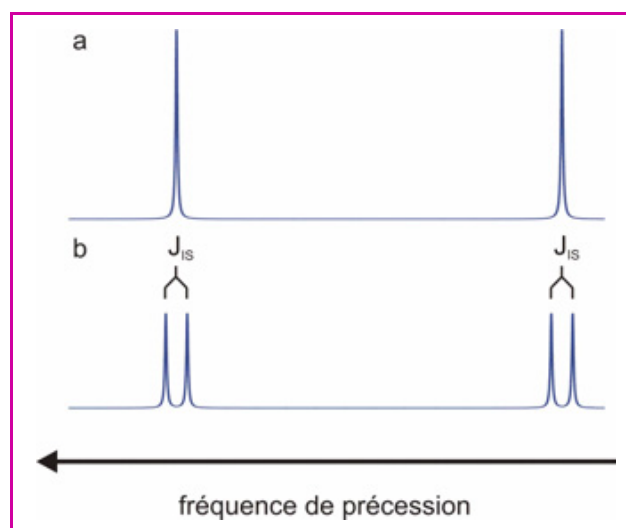


Figure 3 - Spectre d'un système de deux spins : (a) en l'absence de couplage scalaire, chaque noyau donne un signal centré sur sa fréquence de précession ; (b) un couplage scalaire entraîne l'apparition de doublets. Chaque composante du doublet correspond à une transition unique. La différence de fréquence entre deux transitions uniques d'un même noyau est égale au couplage scalaire J_{IS} .

Relaxation dans un système de deux spins 1/2

La relaxation est l'évolution irréversible du système de spins vers un état stationnaire, c'est-à-dire en général vers l'état d'équilibre. Les principaux mécanismes de relaxation sont les fluctuations des interactions de forte amplitude. Ici, ce seront essentiellement les couplages dipolaires avec les noyaux voisins et le déplacement chimique anisotrope du noyau considéré. Dans une protéine, ces interactions dépendent de l'orientation et fluctuent donc au gré des mouvements internes et de la diffusion rotationnelle de la molécule. Plus ce mouvement de rotation globale est lent, plus la relaxation d'une polarisation transverse sera efficace : cette courte mémoire est la principale limite à l'étude de gros édifices biomoléculaires par RMN.

Afin de combattre les grandes vitesses de relaxation des grosses macromolécules biologiques, on peut utiliser des phénomènes d'interférence entre mécanismes de relaxation [6-7]. Pour la relaxation de l'azote-15 du squelette peptidique, ces deux interactions s'additionnent pour l'une des transitions uniques et se soustraient pour l'autre. Il y a interférence destructive entre mécanismes de relaxation. Ceci conduit à une plus grande durée de vie pour cette seconde transition unique de l'azote : cette composante du doublet est plus fine et plus intense (figure 4).

Ce phénomène d'interférence existe aussi pour le proton (bien qu'il soit en général moins prononcé dans une protéine), dont la transition unique à plus basse fréquence a une durée de vie plus longue. On peut voir ainsi sur un spectre de corrélation $^{15}\text{N}-^1\text{H}$ que le pic « sud-est » est plus fin et intense que les autres car il correspond à la corrélation des

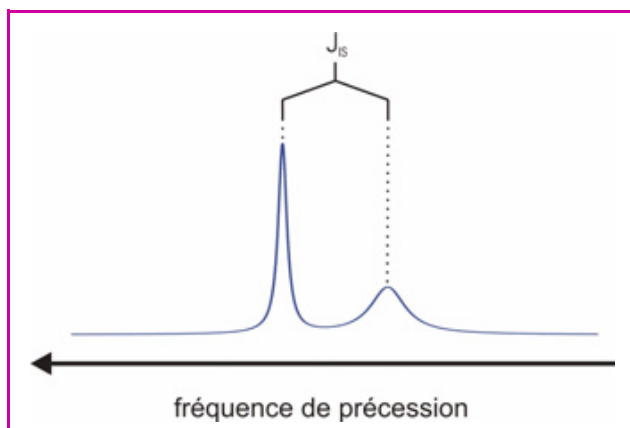


Figure 4 - Spectre d'un noyau d'azote-15 lié à un proton, tel que dans la liaison peptidique dans de grosses protéines.

L'interférence entre des mécanismes de relaxation rend le spectre de la transition unique à plus haute fréquence très fin et celui de la transition à basse fréquence large.

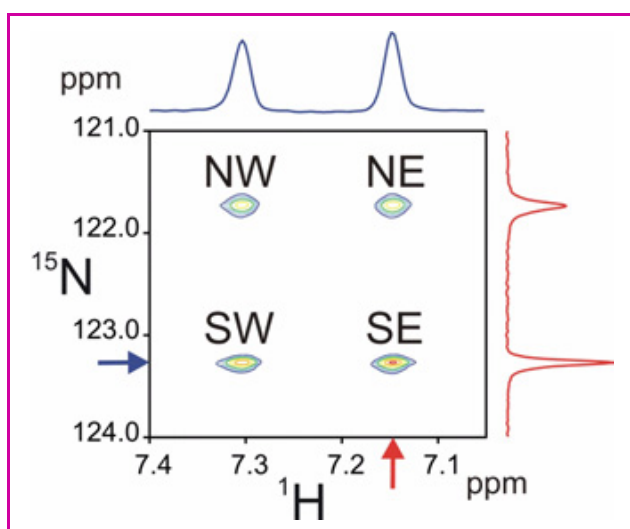


Figure 5 - Spectre de corrélation ^{15}N - ^1H , sans découplage, de la région où se situe le signal de la lysine 11 de l'ubiquitine humaine.

On observe les quatre corrélations possibles entre les deux paires de transitions uniques azote-15 et proton. Comme il est visible sur les coupes du spectre (en bleu et rouge), le pic sud-est est le plus intense, le pic nord-ouest le plus élargi. Une flèche indique le déplacement chimique auquel chaque coupe a été extraite.

deux transitions uniques qui ont la durée de vie la plus longue (figure 5). Ceci a été exploité avec beaucoup de succès par l'équipe de K. Wüthrich [8] : la manipulation de transitions uniques lui a permis d'étudier des édifices d'une masse moléculaire proche du mégadalton [9] alors que la limite précédente était de l'ordre de 50 kDa. Il est donc important de privilégier le développement de techniques employant les transitions uniques pour des applications en RMN des macromolécules biologiques.

Nouvelles expériences sélectives

Sélectivité vis-à-vis du déplacement chimique et de l'état de spin

De nombreuses méthodes RMN sélectives ont été développées dans les vingt dernières années [10]. La façon la plus courante d'effectuer une expérience sélective repose sur

l'approche suivante. Si l'on emploie une impulsion radiofréquence d'amplitude ω_1 , on obtient une nutation de 90° après une durée $t_{90} = \pi/(2\omega_1)$. Le profil de l'impulsion dans le domaine temporel est donc une fonction créneau de durée t_{90} multipliée par une fonction sinusoïdale de pulsation ω_0 . Si l'on utilise une amplitude faible, la durée de l'impulsion doit être plus grande. Sa transformée de Fourier, dans le domaine fréquentiel, est donc plus étroite. Une impulsion de faible amplitude ne touchera ainsi qu'une plage étroite de fréquences : elle sera sélective vis-à-vis du déplacement chimique. La grande majorité des recherches du domaine a concerné la conception de formes d'excitation (impulsion de 90°) ou d'inversion (impulsion de 180°) ayant un profil fréquentiel donné. Cependant, ces méthodes ne sélectionnent qu'un déplacement chimique et sont donc confrontées à l'encombrement des spectres des macromolécules biologiques. Tout comme la RMN biomoléculaire a pu se développer à travers l'emploi d'expériences à deux (ou plus) dimensions de fréquence, il convient de développer des méthodes qui sélectionnent des couples de déplacements chimiques.

Manipuler les deux transitions uniques d'un même noyau de manière distincte nécessite d'être extrêmement sélectif. En utilisant des champs radiofréquence (RF) dont l'amplitude ω_1 est suffisamment petite devant la constante de couplage J_{IS} , on peut irradier une transition unique sans affecter l'autre.

Une méthode de transfert de polarisation, appelée polarisation croisée, consiste à irradier simultanément deux noyaux couplés. La polarisation d'un des deux noyaux, si elle a été préalablement alignée le long du champ RF, est transférée vers l'autre noyau. Nous avons choisi d'employer cette technique en utilisant des champs RF assez faibles pour ne toucher qu'une seule des transitions uniques de chaque noyau. Nous avons montré qu'il existait alors non seulement un transfert entre les deux transitions irradiées, appelé transfert sur résonance, mais également un transfert entre les deux autres transitions, appelé transfert hors résonance [11-13].

L'emploi de champs RF de très basse amplitude afin de sélectionner une transition unique permet d'être également sélectif vis-à-vis des déplacements chimiques proton et azote-15 d'autres paires ^{15}N - ^1H . Si l'on réalise la même expérience que celle présentée figure 5 en utilisant le ST-CP (« single-transition cross-polarization ») pour le transfert de l'azote vers le proton, on n'obtient que deux corrélations (figure 6), ce qui signifie que chaque transition unique de l'azote-15 est transférée vers une seule des deux transitions uniques du proton. On distinguera le transfert sur résonance, entre les polarisations des transitions irradiées, et celui hors résonance entre les deux autres. Plusieurs études théoriques ont été conduites, démontrant notamment une propriété appelée *quasi-isotropie*, c'est-à-dire qu'une polarisation est transférée quelle que soit son orientation dans l'espace [12].

Du transfert sélectif à l'excitation sélective

Ayant mis au point un transfert sélectif vis-à-vis du déplacement chimique, il est possible de développer une excitation sélective en quelques étapes : après une excitation des protons, on transfère, de manière sélective, la polarisation vers l'azote-15. Là, on filtre le signal de façon à ce que seule une polarisation présente sur l'azote-15 pourra être ensuite observée. Enfin, on transfère sélectivement la polarisation vers le proton [14].

Cependant, la mise au point du transfert sélectif ST-CP ne suffit pas pour obtenir ce type d'excitation sélective. En effet, ce transfert manipule des paires de transitions uniques.

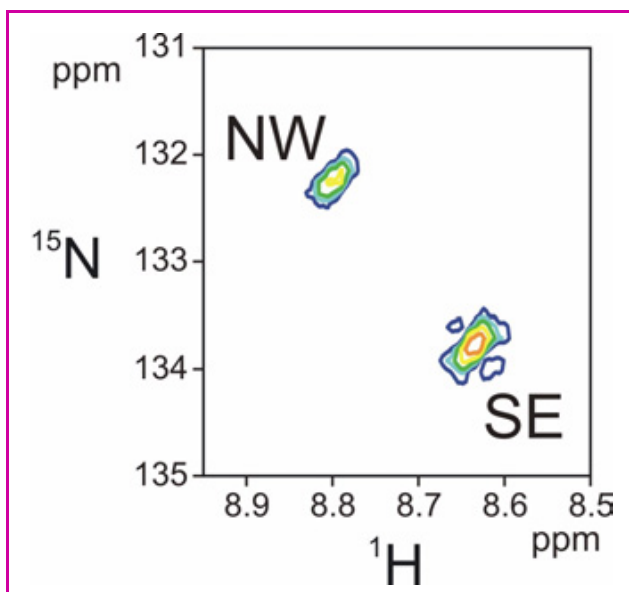


Figure 6 - Signal de la paire ^{15}N - ^1H de l'alanine 46 extrait d'un spectre de corrélation avec transfert par polarisation croisée de transitions uniques. On observe deux corrélations. Le pic sud-est est plus intense que le pic nord-ouest.

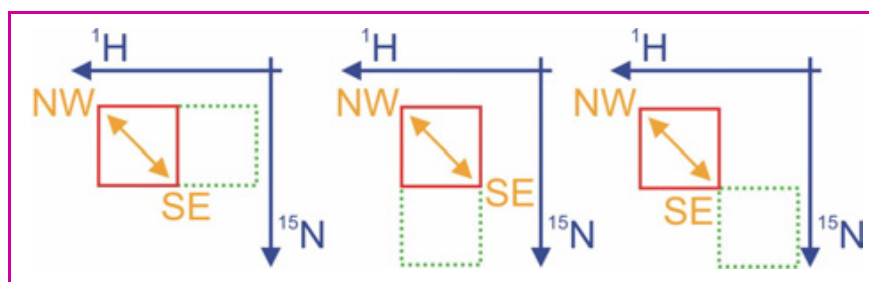


Figure 7 - Représentation des configurations pour lesquelles une excitation FS-ST-CP sépare deux paires de transitions uniques dont les signaux sont superposés. Le signal sélectionné est celui du pic sud-est du carré rouge en traits pleins. Ce pic est superposé (de gauche à droite) au pic sud-ouest, nord-est ou nord-ouest d'une autre paire de spins (carré vert pointillé).

Comme on peut le remarquer sur la *figure 5*, il existe quatre paires de transitions uniques pour chaque paire de spins, cela multiplie par quatre « l'encombrement » effectif d'un spectre. Il faut donc mettre au point un schéma qui sélectionne une paire de spins plutôt qu'une paire de transitions uniques.

Un tel schéma est le FS-ST-CP pour « frequency-switched single-transition cross-polarization » ou polarisation croisée de transitions uniques avec changement de fréquence [15-16]. Lors de cette expérience, comme son nom l'indique, on change la fréquence d'irradiation entre le transfert aller (vers l'azote-15) et le transfert retour (vers le proton). Le coin nord-ouest est irradié lors de l'aller alors que le coin sud-est est irradié lors du transfert retour. Au départ, une polarisation sur le proton est transférée du proton à l'azote-15 par ST-CP hors résonance sur le coin nord-ouest. Une fois la polarisation parvenue sur l'azote-15, celle-ci est filtrée puis transférée par un ST-CP sud-est (sur résonance, cette fois) vers le proton.

La *figure 7* illustre la raison pour laquelle le schéma du FS-ST-CP permet de sélectionner une paire de spins et non une paire de transitions uniques. Les trois situations représentées sont celles pour lesquelles le pic sud-est d'un carré sélectionné est superposé au pic sud-ouest, nord-est ou nord-ouest d'une autre paire de spins. Dans chaque cas, lors du transfert aller, le pic nord-ouest irradié est très éloigné de tout

pic appartenant à la paire de spins non sélectionnée. L'efficacité de ce transfert est donc nulle pour cette autre paire dans ces trois cas. Il ne sera non nul que dans un cas sur quatre, lorsque l'autre pic est également un pic sud-est, c'est-à-dire que les deux carrés sont superposés, en d'autres termes, que les déplacements chimiques de l'azote-15 et du proton sont identiques. Par cette méthode, on sélectionne donc une paire de spins par rapport au déplacement chimique des deux noyaux.

Afin de démontrer expérimentalement la sélectivité de la séquence FS-ST-CP, nous avons mis en œuvre une version 2D de cette expérience au cours de laquelle le déplacement chimique de l'azote-15 est « marqué » entre les transferts aller et retour. Il est ainsi possible d'identifier tout signal résiduel d'une paire ^{15}N - ^1H non sélectionnée, même si le déplacement chimique du proton est identique. L'application de cette méthode à l'excitation sélective du signal de la thréonine 34 de la RNase H d'*Escherichia coli* est présentée sur la *figure 8*. À gauche, est représentée une région – relativement encombrée – du spectre de corrélation ^{15}N - ^1H couplé de la RNase H. À droite, on ne peut observer que le signal de la paire ^{15}N - ^1H de la thréonine 34. On a donc isolé le signal d'un seul noyau d'hydrogène choisi parmi les 1 146 que compte la RNase H !

Applications d'une excitation très sélective

Nous avons inséré la séquence FS-ST-CP dans de nombreuses expériences : NOESY (« nuclear Overhauser effect spectroscopy »), mesure de vitesses de relaxation de l'azote-15, mesure du coefficient de diffusion d'un ARN (voir chapitre suivant) pour identifier l'échange des protons imino avec le solvant... Nous présentons ici l'application à la réalisation d'une expérience de NOESY sélectif. La quasi-totalité des études structurales de protéines emploie deux expériences à trois dimensions de fréquence : NOESY-HSQC

(pour « heteronuclear single-quantum correlation »), avec une dimension azote-15 ou carbone-13. Ces expériences fournissent une grande quantité d'informations : des milliers de contraintes de distances proton-proton. Ces contraintes permettent alors de reconstituer la structure locale de la chaîne polypeptidique (la structure secondaire), ainsi que les

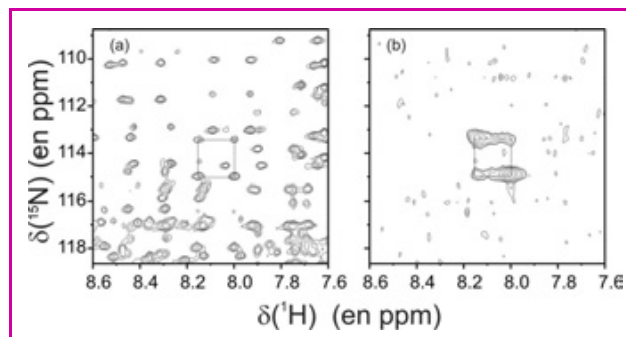


Figure 8 - Une partie des spectres de corrélation ^{15}N - ^1H de la RNase H d'*E. coli*.

Le signal de la thréonine 34 (au centre) est identifié par un carré. (a) Spectre HSQC (« heteronuclear single-quantum correlation ») employant des transferts non sélectifs et (b) spectre FS-ST-CP où la paire ^{15}N - ^1H de la thréonine 34 est sélectionnée. (b) Le niveau de contour le plus bas correspond à 1 % de l'intensité maximum.

contacts entre acides aminés éloignés dans la séquence primaire de la protéine (structure tertiaire). De nombreux programmes ont été développés pour modéliser la structure tridimensionnelle d'une protéine à partir de ces contraintes de distance.

Le principal problème des expériences NOESY-HSQC est leur durée : d'une journée à une semaine. Lorsqu'une question se pose sur un pic du spectre ou une petite région de la protéine, il est souvent difficile de recommencer cette expérience et presque impossible d'en améliorer significativement les caractéristiques (sensibilité, résolution). En employant le FS-ST-CP, on peut isoler une ligne (*i.e.* un spectre proton 1D) NOESY d'un tel spectre, aux coordonnées proton et azote-15 d'un signal sélectionné. Il est ainsi possible d'obtenir rapidement (quelques heures) des informations de meilleure qualité pour affiner la structure d'une région intéressante, tels le site actif d'une enzyme ou l'interface d'un complexe biomoléculaire, ou bien corriger une contrainte inexacte.

L'application à l'étude des voisins du proton amide de la thréonine 14 de l'ubiquitine est présentée sur la *figure 9*. Tout d'abord, l'utilisation du FS-ST-CP a permis de supprimer avec une grande efficacité le signal de l'eau (à 4,7 ppm). Ceci est primordial car il y a environ 10^5 fois plus de noyaux d'hydrogène dans le solvant que chaque proton de la protéine ($\sim 100 \text{ mol.L}^{-1}$ contre $10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$). On sélectionne dans un premier temps la polarisation sur le proton amide de la thréonine 14. Ce proton est ensuite employé comme source dans une expérience NOESY : sa polarisation se propage, à travers l'espace, vers ses plus proches voisins. Outre quelques corrélations (c'est-à-dire des relations de proximité) dites séquentielles (avec les protons du squelette des résidus voisins), la corrélation avec les protons du méthyle γ_2 de l'isoleucine 13 indique l'orientation de cette chaîne latérale (c'est-à-dire l'angle dièdre autour de la liaison $\text{C}^\alpha\text{C}^\beta$). Cette illustration montre comment un outil très fondamental (une méthode de transfert de polarisation) peut être développé afin de fournir des informations pertinentes concernant, par exemple, la structure ou la dynamique d'une biomolécule [16].

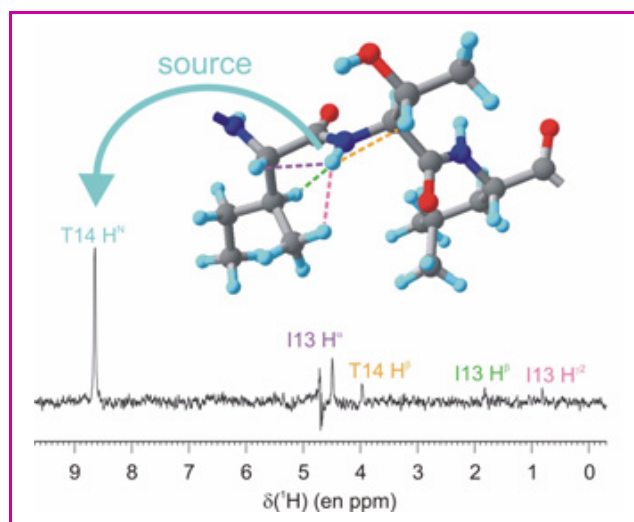


Figure 9 - Spectre NOESY sélectif à partir du proton amide de la thréonine 14 de l'ubiquitine humaine et structure de l'ubiquitine au voisinage de ce proton.

Ce proton amide est excité de manière très sélective grâce à la séquence FS-ST-CP : il n'y a plus qu'une seule source de polarisation dans la protéine. Cette polarisation est ensuite amenée à se propager à travers l'espace vers les plus proches voisins de ce proton (traits discontinus). Les attributions des pics sont représentées avec un code couleur se référant aux distances indiquées dans la structure. L'expérience a duré une heure.

Nouvelles expériences à basse résolution

Lorsque le spectre RMN d'un échantillon n'offre pas une résolution suffisante pour séparer les signaux des noyaux d'une molécule, il est impossible d'obtenir une information locale. On trouve souvent de tels systèmes, notamment au cours de l'optimisation des conditions de préparation d'une solution de protéine pour une étude RMN, *a fortiori* s'il s'agit d'une protéine membranaire. Il est toutefois possible de mesurer le coefficient de diffusion translationnelle de l'édifice observé, dont on peut extraire une information sur la taille, la forme de l'édifice, son état d'agrégation ou ses interactions éventuelles.

Mesurer un coefficient de diffusion translationnelle par RMN : gradients de champ et échos

La mesure du coefficient de diffusion translationnelle d'une molécule ou d'un édifice supramoléculaire implique de pouvoir repérer sa position. En RMN, l'utilisation de gradients du champ B_0 permet de marquer cette position. L'emploi le plus fructueux des gradients de champ est celui qui consiste à produire des images *in vivo* par ce que l'on appelle l'IRM, imagerie par résonance magnétique (nucléaire).

Durant l'application d'un gradient de champ, ce dernier peut s'écrire : $B_0 + gz$, où z est la position suivant l'axe vertical et g l'intensité du gradient dB_z/dz (sur un équipement standard, sa valeur maximale est de l'ordre de $0,5 \text{ T.m}^{-1}$). La pulsation de Larmor est alors une fonction affine de la position : $\omega_0(z) = -\gamma B_0 - \gamma gz$. On peut décrire l'évolution des polarisations dans un référentiel tournant à la pulsation $\omega_0 = -\gamma B_0$, où $\tilde{\omega}_0(z) = -\gamma gz$. L'effet d'une impulsion de gradient de champ est représenté sur les deux premiers schémas au bas de la *figure 10* : dans le référentiel tournant, les extrémités des vecteurs de polarisation forment une structure hélicoïdale, dont le pas est inversement proportionnel à $\gamma g \delta$, où δ est la durée du gradient. Le signal macroscopique correspond à l'intégrale des signaux de chaque tranche d'échantillon ; il est donc nul. On dit que la polarisation est *défocalisée*. Il est cependant possible d'inverser les phases acquises durant le gradient par l'application d'une impulsion 180° (*figure 10*). Un nouveau gradient, de même durée et de même intensité,

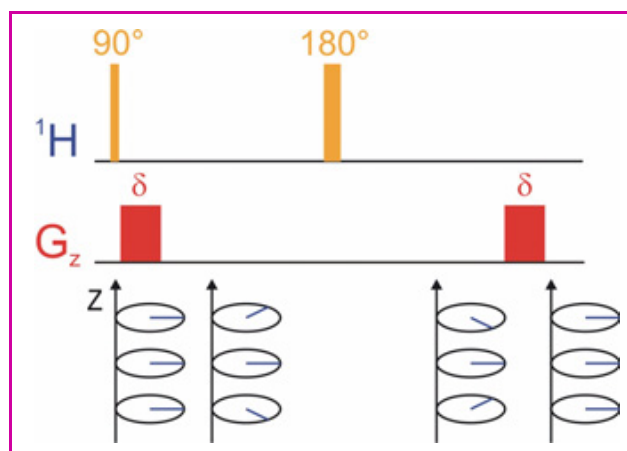


Figure 10 - Principe de l'écho de spin (écho de gradient).

Les rectangles orange représentent des impulsions 90° ou 180° , ceux en rouge, l'application d'un gradient de champ. Les vecteurs de polarisation du proton de trois tranches de l'échantillon sont représentés en bleu.

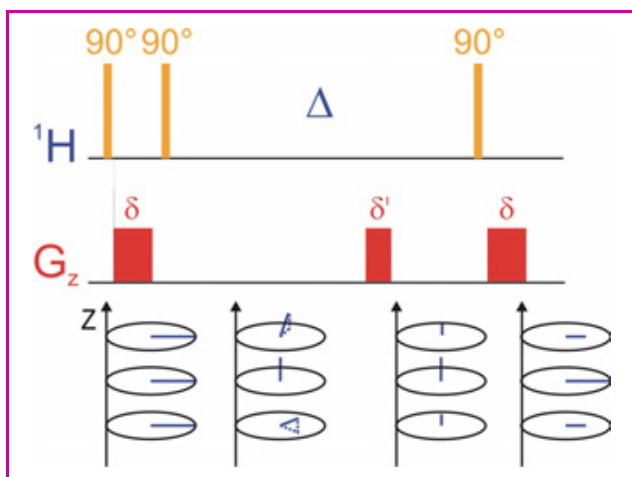


Figure 11 - Principe de l'écho stimulé. Les codes sont les mêmes que ceux de la figure 10.

produit la même évolution que le premier et déroule l'hélice pour aboutir à une situation où les vecteurs de polarisation de chaque tranche sont à nouveau en phase. On dit que la polarisation macroscopique est *refocalisée* : c'est un *écho* de spin [17].

Si un délai Δ est inséré entre les deux impulsions de gradients de champ, la diffusion translationnelle des molécules entraîne que leur position et la pulsation associée $\omega_0(z)$ ne sont pas exactement les mêmes lors de ces deux impulsions. Ainsi, la refocalisation n'est pas parfaite et l'écho est atténué. On peut alors quantifier la réduction de signal et relier cette valeur au coefficient de diffusion D .

Cependant, cette technique n'est presque jamais utilisée telle quelle. En effet, le signal est également atténué par la relaxation des polarisations transverses de temps caractéristique T_2 . Ce temps est souvent très court lorsque l'édifice observé est de grande taille (voir précédemment). On préfère une variante exposée sur la figure 11 appelée écho stimulé [2, 18]. Cette expérience consiste à stocker sous forme de polarisation longitudinale l'information sur la phase (le cosinus de celle-ci). La polarisation transverse résiduelle est éliminée par un deuxième gradient. Après une dernière impulsion de 90° , la polarisation est refocalisée par l'application d'une impulsion de gradient identique à la première. On perd la moitié du signal (on observe la moyenne d'une fonction cosinus au carré), mais la relaxation longitudinale (de temps T_1) pendant le délai Δ est beaucoup plus lente que la relaxation transverse, de telle sorte que le solde est très positif.

Pour l'étude de macromolécules biologiques, l'expérience d'écho stimulé permet d'atteindre des délais de diffusion Δ de l'ordre de 100 ms. Au-delà, la vitesse de relaxation longitudinale des protons est trop grande et le signal est contaminé par celui de l'eau. Il est alors difficile de mesurer le coefficient de diffusion d'un édifice biomoléculaire de grande taille avec un équipement standard. Nous avons développé une séquence d'impulsion appelée écho stimulé hétéronucléaire [19] dans laquelle l'information de phase est stockée sous la forme de la polarisation longitudinale d'un noyau dont le T_1 est plus long que celui des protons, comme l'azote-15 dans une protéine. Le principe de cette expérience est exposé figure 12. Après l'avoir encodée sur les protons, on transfère la polarisation vers l'azote-15 où elle est stockée pendant le délai de diffusion Δ . La polarisation est ensuite transférée vers les protons où elle est décodée et observée. On trouve ainsi une configuration optimale où la polarisation

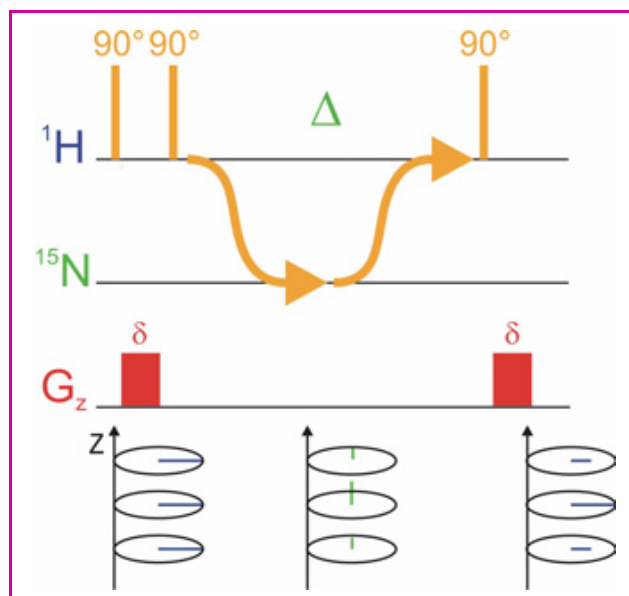


Figure 12 - Principe de l'expérience d'écho stimulé hétéronucléaire.

Les codes sont les mêmes que ceux de la figure 10. La couleur verte correspond à une polarisation des noyaux d'azote-15.

est codée/décodée efficacement sur le proton (de grand rapport gyromagnétique) et stockée avec un minimum de perte sur l'azote-15 (qui a un long T_1).

Nous avons appliqué cette expérience à plusieurs systèmes : la protéine ubiquitine, un ARN de transfert et le domaine transmembranaire de la protéine OmpA (« outer membrane protein A ») d'*E. coli*, solubilisé dans une solution de détergents. Ces derniers résultats sont présentés figure 13. Il nous a été possible d'atteindre un délai de diffusion de 1 s, soit un ordre de grandeur plus long que dans une expérience d'écho stimulé. Le coefficient de diffusion obtenu donne un rayon hydrodynamique de 4,2 nm, correspondant à un nombre d'agrégation faible. Cette valeur est compatible avec une forme monomérique pour la protéine dont le tonneau β est recouvert par des molécules de détergent.

Conclusion

Nous avons présenté deux axes de recherche en dehors des approches conventionnelles de RMN appliquée aux macromolécules biologiques. En changeant l'échelle de

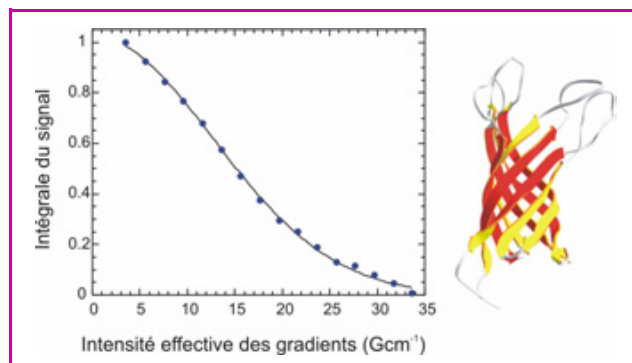


Figure 13 - Atténuation du signal expérimental (disques) et ajusté (courbe) en fonction de l'intensité des gradients pour l'expérience d'écho stimulé hétéronucléaire appliquée à la protéine OmpA dont la structure (code pdb 1G90) est présentée à droite. Le coefficient de diffusion ajusté est $D = (6,43 \pm 0,10) \times 10^{-11} \text{ m}^2\text{s}^{-1}$.

l'information recherchée – soit locale et à haute résolution, soit globale et à basse résolution –, nous avons montré l'adaptabilité de l'outil RMN au problème qui est posé au spectroscopiste. Les applications potentielles des méthodes développées sont nombreuses : l'excitation sélective introduite est un module qu'il a été possible d'insérer dans de nombreuses expériences RMN. D'après les informations fournies par les utilisateurs eux-mêmes, la méthode de mesure de coefficients de diffusion est très aisée à mettre en œuvre. Des développements récents permettent d'accéder à des échelles de temps encore plus longues mais sont limités à des systèmes de spin particuliers.

Remerciements

L'auteur tient à remercier toutes les personnes qui ont contribué à ce travail, en particulier son directeur de thèse Geoffrey Bodenhausen et Thomas R. Eyky, ainsi qu'Emanuel Winterfors, Jean-Pierre Baltaze, Ludovic Jullien, Isabelle Aujard, Claire Mangenet, Damien Alcor (École Normale Supérieure), Jean-Luc Popot, Manuela Zoonens et Dror E. Warschawski (Institut de biologie physico-chimique, Paris).

Références

- [1] Cavanagh J., Fairbrother W.J., Palmer III A.G., Skelton N.J., *Protein NMR Spectroscopy: Principles and Practice*, Academic Press, New York, **1996**.
- [2] Johnson C.S., Diffusion ordered nuclear magnetic resonance spectroscopy: principles and applications, *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy*, **1999**, 34, p. 203.
- [3] Levitt M.H., *Spin Dynamics: Basics of Nuclear Magnetic Resonance*, John Wiley & Sons, Chichester, **2001**.
- [4] Keeler J., *Understanding NMR Spectroscopy*, John Wiley & Sons, Chichester, **2005**.
- [5] Goldman M., *Quantum Description of High Resolution NMR in Liquids*, Clarendon Press, Oxford, **1988**.
- [6] Goldman M., Interference effects in the relaxation of a pair of unlike spin-1/2 nuclei, *J. Magn. Reson.*, **1984**, 60, p. 437.
- [7] Kumar A., Grace R.C.R., Madhu P.K., Cross-correlations in NMR, *Prog. NMR Spectrosc.*, **2000**, 37, p. 191.
- [8] Pervushin K., Riek R., Wider G., Wüthrich K., Attenuated T-2 relaxation by mutual cancellation of dipole-dipole coupling and chemical shift anisotropy indicates an avenue to NMR structures of very large biological macromolecules in solution, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1997**, 94, p. 12366.
- [9] Fiaux J., Bertelsen E.B., Horwich A.L., Wüthrich K., NMR analysis of a 900K GroEL-GroES complex, *Nature*, **2002**, 418, p. 207.
- [10] Emsley L., *Nuclear Magnetic Resonance Pt C*, **1994**, 239, p. 207.
- [11] Ferrage F., Eykyn T.R., Bodenhausen G., Coherence transfer by single-transition cross-polarization: quantitation of cross-correlation effects in nuclear magnetic resonance, *J. of Chem. Phys.*, **2000**, 113, p. 1081.
- [12] Eykyn T.R., Ferrage F., Bodenhausen G., Quasi-isotropic single-transition cross-polarization in nuclear magnetic resonance, *J. of Chem. Phys.*, **2002**, 116, p. 10041.
- [13] Eykyn T.R., Ferrage F., Winterfors E., Bodenhausen G., Single-transition coherence transfer by adiabatic cross polarization in NMR, *ChemPhysChem*, **2000**, 1, p. 217.
- [14] Pelupessy P., Chiarparin E., Hartmann-Hahn polarization transfer in liquids: An ideal tool for selective experiments, *Concepts in Magnetic Resonance*, **2000**, 12, p. 103.
- [15] Ferrage F., Eykyn T.R., Bodenhausen G., Highly selective excitation in biomolecular NMR by frequency-switched single-transition cross-polarization, *J. Am. Chem. Soc.*, **2002**, 124, p. 2076.
- [16] Ferrage F., Eykyn T.R., Bodenhausen G., Frequency-switched single-transition cross-polarization: a tool for selective experiments in biomolecular NMR, *ChemPhysChem*, **2004**, 5, p. 76.
- [17] Hahn E.L., Spin echoes, *Phys. Rev.*, **1950**, 80, p. 580.
- [18] Alcor D., Allemand J.F., Cogné-Laage E., Croquette V., Ferrage F., Jullien L., Kononov A., Lemarchand A., Stochastic resonance to control diffusive motion in chemistry, *J. Phys. Chem. B*, **2005**, 109, p. 1318.
- [19] Ferrage F., Zoonens M., Warschawski D.E., Popot J.L., Bodenhausen G., Slow diffusion of macromolecular assemblies measured by a new pulsed field gradient NMR method : a) *JACS*, **2003**, 125, p. 2541 ; b) *JACS*, **2004**, 126, p. 5654.



Fabien Ferrage

est chargé de recherche au CNRS et travaille au sein de l'UMR 8642, « Biomolécules : synthèse, structure et mode d'action », Département de chimie de l'ENS*. Il a reçu le **prix de thèse 2003 de la division Chimie physique**, division commune à la Société Française de Chimie et à la Société Française de Physique.

* CNRS UMR 8642, École Normale Supérieure, Département de chimie, 24 rue Lhomond, 75231 Paris Cedex 05.
Courriel : ferrage@chimie.ens.fr




Nous utilisons des matières premières renouvelables issues de la nature et les transformons en produits ultra-performants dans le plus grand respect de l'environnement.



Acteur mondial de premier plan dans le secteur de la chimie de spécialités, Cognis axe sa démarche sur des tendances internationales comme le bien-être et le développement durable. Avec nos produits, nos concepts marketing et nos solutions personnalisées, nous apportons des impulsions nouvelles sur de nombreux marchés industriels : cosmétiques, soins corporels, détergents et lessives, denrées alimentaires, nutrition et santé, vernis et peintures, lubrifiants, textiles, phytosanitaire ou extraction pétrolière.



Tous les sites de Cognis sont soumis aux mêmes exigences très strictes en terme de qualité, environnement, santé, social et sécurité. Nous apportons la même attention à tous : collaborateurs, clients, toutes personnes directement concernées par nos activités.

En 2000, Cognis devient la première entreprise de chimie à recevoir deux certifications mondiales, ISO 14001 et ISO 9001 pour ses cycles de gestion qualité et environnement



Cognis France
185 avenue de Fontainebleau
F-77310 Saint Fargeau Ponthierry
TEL : +33 1 60 65 21 00
FAX : +33 1 60 65 21 01
<http://www.cognis.com>