

La RMN biomoléculaire ou la révolution en mouvement

Loïc Salmon et Martin Blackledge

Résumé

La résonance magnétique nucléaire permet de sonder au niveau atomique le mouvement des molécules biologiques à un niveau de détail et de précision jusqu'alors inaccessible. Aussi anodin que cela puisse paraître, les récentes découvertes associées à ce domaine sont en train de bouleverser notre compréhension des mécanismes moléculaires régissant le fonctionnement du vivant, offrant ainsi l'opportunité de redessiner un cadre conceptuel pour la rationalisation de ces phénomènes.

Mots-clés

RMN, biologie structurale, mouvements moléculaires, interaction dipolaire, dynamique conformationnelle.

Abstract

The biomolecular RMN or the revolution in motion

Nuclear magnetic resonance probes molecular motions at atomic resolution in hitherto inaccessible detail. Recent discoveries are revolutionising our understanding of the molecular mechanisms that govern biological function, providing the opportunity to reconsider the role of protein dynamics in the molecular processes of life.

Keywords

NMR, structural biology, molecular motions, dipolar interaction, conformational dynamics.

La compréhension du fonctionnement des organismes vivants reste l'un des grands défis de la science contemporaine, mobilisant une incroyable diversité de disciplines et de techniques différentes. La RMN est un outil de choix pour s'intéresser à ces questions. Si les analyses issues de l'imagerie par résonance magnétique – nucléaire – (IRM) restent relativement connues par leurs applications en neurosciences ou en imagerie médicale, la RMN, appliquée à l'étude des macromolécules biologiques, se fait quant à elle beaucoup plus discrète, bien qu'elle soit en train de créer une véritable petite révolution scientifique dans le monde de la biologie structurale. Retour sur l'apparition d'un nouveau paradigme.

C'est à la toute fin du XIX^e siècle que les premières hypothèses sur les mécanismes régissant les interactions entre molécules biologiques ont été émises. Le principe alors proposé par Emil Fischer est basé sur la complémentarité de forme. Si deux partenaires ont des structures tridimensionnelles complémentaires, alors ils peuvent interagir ensemble créant une entité appelée complexe dont l'interface est dictée par leur complémentarité topologique. Ce principe sous-tend toute la biologie structurale ; en effet, connaître la structure d'une molécule, par exemple une protéine, permettait de déterminer avec qui elle pouvait interagir : une autre protéine, l'ADN, un médicament... et ainsi trouver sa fonction ou expliquer son fonctionnement.

Historiquement la première source d'information sur la structure des macromolécules biologiques fut la cristallographie aux rayons X qui, par l'observation de figures de diffraction, permit de remonter à la structure tridimensionnelle d'un composé. La RMN, développée plus tardivement, a passé de nombreuses années à courir après la cristallographie afin de faire ses preuves comme méthode d'intérêt pour caractériser la structure des protéines. Jusque là, rien de révolutionnaire.

Au fil du temps et du développement d'appareils et d'expériences de plus en plus précises, les spectroscopistes se sont aperçus qu'une description structurale de leurs données était insuffisante pour en décrire tous les aspects. C'est alors qu'ils ont – enfin – commencé à pouvoir décrire les systèmes qu'ils étudiaient avec toute la complexité qu'ils requièrent, c'est-à-dire en décrivant les mouvements de ces systèmes. En effet, des composés tels que les protéines sont constitués de centaines, voire de milliers d'atomes soumis à l'agitation thermique ; ainsi vibrations, rotations et réorientations de domaines les animent constamment.

Mais comment observe-t-on de tels phénomènes ? Par exemple, les protéines ont des dimensions de l'ordre de quelques dizaines d'Ångströms et l'observation de mouvements dans de tels objets nécessite de pouvoir les observer à une résolution très fine, si possible atomique. Le premier atout de la RMN est de pouvoir fournir cette résolution atomique par l'utilisation de très hauts champs et d'expériences multidimensionnelles. En effet, cela permet d'obtenir des expériences à très haute résolution pour lesquelles la majorité – voire la totalité – des signaux observés peuvent être identifiés puis attribués à un atome donné (*figure 1*, spectre bleu). Le second et tout aussi important atout de la RMN est d'être sensible à des échelles de temps très variées, s'étalant de la dizaine de picosecondes jusqu'à la seconde et au-delà.

La principale source d'information en RMN sur la dynamique des macromolécules biologiques vient de l'interaction dipolaire. Chaque atome actif en RMN, c'est-à-dire possédant un spin nucléaire non nul, engendre dans son voisinage un petit champ magnétique (*figure 2* représentant deux spins nucléaires, I (bleu) et S (rouge), et les lignes de champs magnétiques qu'ils génèrent). Ce champ magnétique va alors interagir avec les spins adjacents – eux aussi source

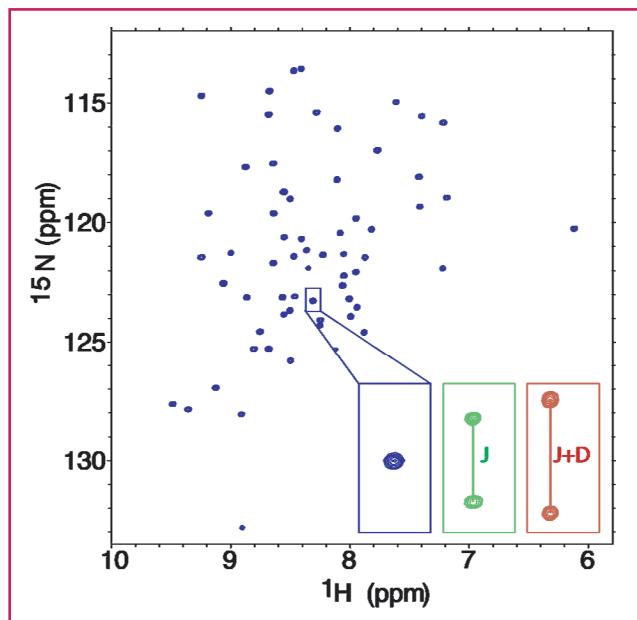


Figure 1 - Spectre RMN bidimensionnel caractéristique d'une protéine.

Chaque résonance du spectre peut être attribuée à une liaison chimique entre les atomes d'azote et d'hydrogène d'une fonction amide de la chaîne principale. En présence de découplage adéquat (bleu), un seul signal est observé par liaison. Néanmoins, un couplage scalaire (J) existe naturellement entre ces deux atomes. Il est observable en absence de découplage (vert). Si de plus la mesure se fait en milieu anisotrope, alors le couplage mesuré est la somme des couplages scalaire et dipolaire (rouge).

de petits champs magnétiques – pour engendrer l'interaction dipolaire. Si l'arrangement spatial entre deux spins interagissant est modifié, alors l'interaction dipolaire va elle aussi être altérée car le champ ressenti par les spins va être modifié (figure 2 : le spin S bouge de la position rouge à la position orange). Les mouvements internes incessants des molécules vont moduler la géométrie de l'édifice moléculaire et ainsi induire de petits champs magnétiques variables dans le temps, aux fréquences caractéristiques des mouvements présents. Ces derniers pourront alors induire des transitions entre différents états de spin, contribuant ainsi au processus de relaxation, c'est-à-dire de retour à l'équilibre d'un échantillon placé hors équilibre (la mise hors équilibre constituant l'expérience RMN). Cette source d'information permet d'obtenir de l'information aux échelles de temps dites rapides, soit plus rapides que la réorientation moléculaire – typiquement de l'ordre de la dizaine de nanosecondes –, car celle-ci va masquer l'effet des mouvements internes.

Cette interaction peut être aussi observée de manière plus directe par des études de RMN en milieu liquide anisotrope comme les cristaux liquides. En effet, l'interaction dipolaire tend à globalement s'annuler dans les milieux isotropes, où la réorientation moléculaire se fait librement et ne se manifeste dans un spectre RMN qu'à travers les propriétés de relaxation du composé étudié. La présence d'anisotropie permet d'atténuer cet estompe et d'observer directement cette interaction, sous forme de couplages dipolaires résiduels. Dans le cas de deux spins interagissant déjà par l'intermédiaire de couplages scalaires – à travers les liaisons chimiques –, cette interaction dipolaire résiduelle va venir s'ajouter à ce couplage et devient ainsi directement accessible (figure 1, encadré vert, même spectre que le spectre bleu mais le couplage scalaire est observé ; encadré rouge, même spectre que le vert mais réalisé en milieu

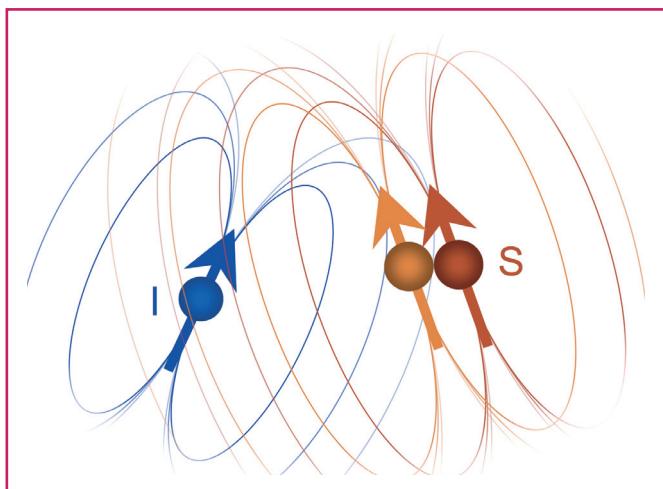


Figure 2 - Interaction dipolaire et relaxation.

Le spin I (bleu) génère un champ magnétique, représenté par ses lignes de champs, ressenti par le spin S (rouge) et inversement. Cette interaction réciproque constitue l'interaction dipolaire. Si le spin S se rapproche spatialement (orange), alors le champ magnétique ressenti par le spin I est modifié (et vice versa), ce qui entraîne une modulation de l'interaction dipolaire. L'agitation thermique, qui induit aléatoirement de telles modulations, est à l'origine des processus de relaxation.

anisotrope). L'effet de la dynamique lente, jusqu'à la milliseconde, n'étant plus complètement gommé par la réorientation moléculaire, va enfin être accessible. Et c'est ici que la révolution commence, les mouvements d'intérêt biologique – catalyse, reconnaissance moléculaire... – se déroulant typiquement aux échelles de temps allant de la micro- à la milliseconde.

Mais si la RMN permet d'obtenir de l'information sur les mouvements moléculaires, reste encore à la décoder. Pour ce faire, plusieurs approches sont concevables : il est possible d'utiliser un modèle de mouvement raisonnable – justifiable par les propriétés physico-chimiques du système – ou de s'aider des simulations moléculaires. Dans le premier cas, certaines hypothèses sont faites sur le mouvement moléculaire, par exemple la chaîne principale d'une protéine peut être découpée en petites entités rigides, les plans peptidiques, qui se réorientent les uns par rapport aux autres en suivant un mouvement diffusif (figure 3). Ce type

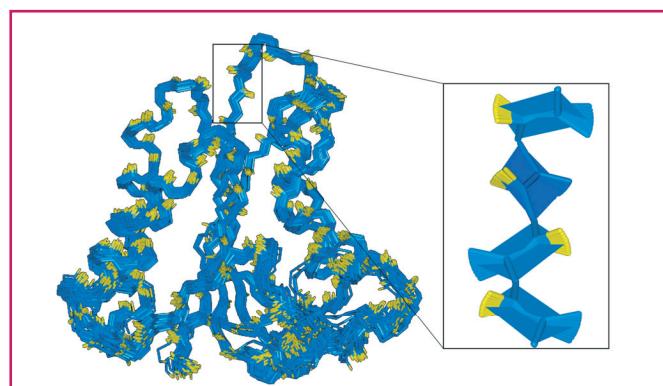


Figure 3 - Modélisation du mouvement de la chaîne principale d'une protéine par un modèle biophysique (encart).

Chaque plan peptidique (représenté par un quadrilatère) peut se réorienter selon des directions propres au modèle utilisé. La dynamique obtenue est alors présentée sous forme d'une déviation angulaire par rapport à leur orientation moyenne.

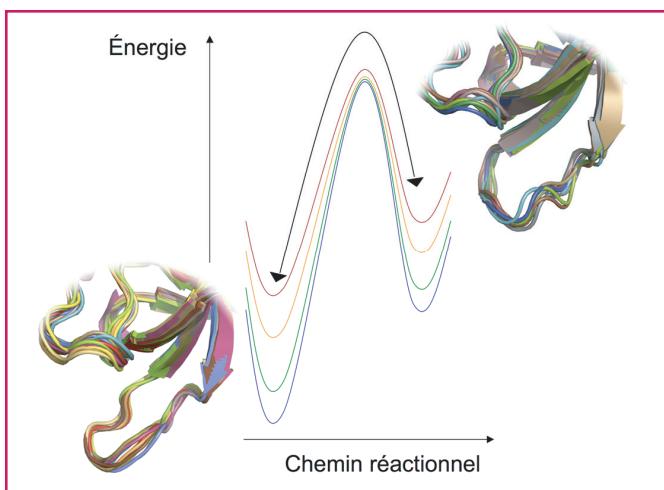


Figure 4 - Simulations moléculaires et accélération temporelle.

Pour réaliser la transition entre deux conformations (minimum énergétique à gauche et à droite), une importante barrière énergétique (centre, bleu) doit être franchie. Le temps nécessaire à cette transition dépend de la hauteur de la barrière énergétique. La dynamique moléculaire accélérée abaisse artificiellement cette barrière (accélération croissante de vert à rouge) et permet d'accroître artificiellement la vitesse de transition entre ces deux états.

d'approche analytique a conduit à de nombreuses avancées dans la caractérisation du mouvement des protéines, permettant de déterminer quantitativement l'amplitude et la direction des mouvements des plans peptidiques et de montrer la présence de mouvements corrélés, et de mettre en lumière l'existence de mouvements lents dans les régions clefs pour la reconnaissance moléculaire.

Une autre approche très complémentaire consiste à utiliser les simulations de dynamiques moléculaires pour générer des ensembles de structures représentatives de la dynamique du système considéré. Ces simulations sont fondamentalement guidées par la dynamique newtonienne, au sein d'un potentiel d'énergie censé représenter l'état physico-chimique du système. Ce potentiel, appelé champ de force, tend à décrire toutes les interactions régissant le comportement d'une molécule : forces de van der Waals, liaisons hydrogène, interactions électrostatiques, déformations de la géométrie des liaisons chimiques, interactions avec le solvant... Une fois ce potentiel connu, il est possible de laisser le système évoluer et de suivre ses modifications au cours du temps. Ces trajectoires permettent d'obtenir une caractérisation des mouvements moléculaires, mais restent encore limitées avec des supercalculateurs modernes à des durées souvent inférieures à la microseconde, soit juste avant la plage d'intérêt pour les mouvements biologiquement importants. Dommage. Mais s'agissant de simulations moléculaires, la notion de temps – nécessaire pour observer un phénomène – reste intimement prédefinie par le potentiel utilisé. Si une barrière énergétique est difficile à franchir, elle ne le sera que rarement et demandera beaucoup de temps pour pouvoir être observée. Si cette barrière est artificiellement diminuée, alors la transition sera plus fréquente et le « temps » s'en trouvera accéléré (figure 4). Ces dynamiques moléculaires accélérées permettent de sonder les échelles de temps pertinentes pour l'interprétation des couplages dipolaires résiduels et ainsi d'apporter une description complémentaire à celles basées sur des modèles biophysiques.

Ces deux types d'approche, encore en plein développement, ont pour l'instant été appliquées avec succès à l'étude de plusieurs protéines aboutissant à une surprenante convergence. Cette convergence extrêmement encourageante témoigne d'un niveau de précision suffisant pour enfin pouvoir s'intéresser au véritable impact de cette dynamique sur les processus biologiques tels que la transmission d'information sur de longues distances et les processus de reconnaissance moléculaire. Cette dernière question reste particulièrement débattue aujourd'hui. En effet, si les molécules sont en constant mouvement, comment expliquer en détail leurs interactions, puisqu'il devient *stricto sensu* impossible d'appliquer le principe de complémentarité de forme ? Est-ce que chaque partenaire échantillonne différentes conformations indépendamment et interagissent-ils ensuite lorsqu'ils adoptent deux formes complémentaires ? Ou est-ce que ces composés commencent à interagir et peu à peu modulent leur topologie pour pouvoir conduire à une possible complémentarité ?

Ce n'est qu'aujourd'hui qu'il devient enfin possible d'étudier de tels processus dynamiques à une résolution atomique permettant ainsi de déterminer l'impact d'un comportement dynamique sur des systèmes biologiques jusqu'ici souvent analysés en termes statiques. Ces questions demeurent encore ouvertes car ce domaine de recherche particulièrement jeune n'a pas encore eu le temps de s'épanouir pleinement pour atteindre la taille suffisante pour prétendre à une véritable généralité, mais il permet déjà de toucher du doigt un monde jusqu'alors ignoré.

Il a fallu d'incroyables révolutions scientifiques pour concevoir que l'homme n'était qu'une espèce en perpétuelle évolution, vivant dans un univers hautement dynamique ; il n'en faudra qu'une de plus pour concevoir que les principes nécessaires à la vie, au moins telle que nous l'entendons, sont intimement basés sur un incessant ballet d'éléments en perpétuel mouvement. Même si nous ne commençons qu'à l'apercevoir, encore une fois, la révolution est en marche !

Pour en savoir plus

- Salmon L., Bouvignies G., Markwick P., Blackledge M., Nuclear magnetic resonance provides a quantitative description of protein conformational flexibility on physiologically important time scales, *Biochemistry*, 2011, 50(14), p. 2735-47.



L. Salmon

Après sa thèse sous la direction de Martin Blackledge, **Loïc Salmon** travaille actuellement dans le groupe du professeur Hashim al-Hashimi à l'Université du Michigan (Ann Arbor, E.-U.), où il étudie la dynamique des molécules d'ARN.



M. Blackledge

Martin Blackledge (auteur correspondant) est directeur de recherche au CEA Énergies alternatives et directeur de l'équipe « Protein Dynamics and Flexibility by NMR » à l'Institut de Biologie Structurale de Grenoble*.

* Institut de Biologie Structurale J.-P. Ebel, 41 rue Jules Horowitz, F-38027 Grenoble Cedex 1.
Courriel : martin.blackledge@ibs.fr