

Mesurer l'échange rapide de protons par RMN

Estel Canet, Fatiha Kateb, Takuya F. Segawa, Akansha Ashvani Sehgal, Geoffrey Bodenhausen et Philippe Pelupessy

Résumé Grâce au développement de méthodes nouvelles de résonance magnétique nucléaire (RMN), il est possible de mesurer les vitesses d'échange de protons entre des acides aminés et l'eau. Cet article décrit comment ces travaux s'insèrent dans une longue histoire et comment les auteurs ont réussi à repousser les limites des vitesses accessibles par la RMN de près de deux ordres de grandeur, jusqu'à 10^5 événements par seconde.

Mots-clés RMN, échange chimique, cinétique, effet isotopique cinétique.

Abstract **Determination of fast exchange of protons by NMR spectroscopy**

Owing to the development of new methods that exploit nuclear magnetic resonance (NMR), it has become possible to determine exchange rates of protons that hop between amino acids and water. This paper describes how these novel methods result from a long history, and how the authors have been able to push the limits in terms of exchange rates by nearly two orders of magnitude, up to 10^5 events per second.

Keywords NMR, chemical exchange, kinetics, kinetic isotope effect.

Tout étudiant en chimie, et même tout lycéen en filière scientifique, apprend que les réactions acides-bases sont extrêmement rapides. Cela tient, dit-on, au caractère furtif de l'ion H^+ qui peut diffuser très rapidement, surtout en milieu aqueux, par le truchement d'une cascade de réactions de transfert du type $H_3O^+ + H_2O \rightarrow H_2O + H_3O^+$. Dès que l'étudiant se demande comment les vitesses de telles réactions peuvent être déterminées, il risque d'avoir de la peine à trouver des réponses satisfaisantes.

La résonance magnétique nucléaire (RMN) est surtout connue pour son utilité en synthèse, car les produits obtenus peuvent être rapidement identifiés. La RMN est aussi connue pour la détermination de la structure et de la dynamique interne de biomolécules telles que des protéines, des acides nucléiques et leurs complexes. Beaucoup moins connues sont ses applications à la mesure de vitesses de réactions, notamment d'échange de protons. Par rapport aux autres techniques, la RMN a l'avantage de donner des informations avec une résolution atomique, ce qui est particulièrement important lorsqu'il y a plusieurs sites d'échange. De telles mesures peuvent fournir des informations sur des aspects structurels et dynamiques d'une large gamme de molécules [1-2]. Ainsi, Guéron, Leroy et leurs collaborateurs ont étudié la cinétique d'ouverture de paires de bases [3] dans l'ARN de transfert [4], dans l'ADN-B [5], et dans des complexes formés par l'ADN et certains médicaments [6]. Les protons qui peuvent échanger rapidement dans une macromolécule correspondent à des régions exposées au solvant. Par contre, ceux qui n'échangent que lentement correspondent à des régions plus protégées de la macromolécule. On peut, de cette manière, mettre en évidence des « facteurs de protection » dans des complexes de protéines [7]. Ainsi, Paterson, Englander et Roder ont montré que la mesure des taux d'échange permettait de caractériser l'interaction d'un antigène protéique, le cytochrome C du cheval, avec un anticorps monoclonal [8].

Les vitesses d'échange lentes peuvent être mesurées en suivant le remplacement d'un proton H^+ par un ion deutérium D^+ en temps réel [9]. Plusieurs méthodes ont été développées pour étudier l'échange plus rapide [10-13]. Ces méthodes ne permettent de mesurer que des vitesses d'échange allant jusqu'à quelques $10^3 s^{-1}$ dans des conditions favorables ; pour les macromolécules, la limite supérieure des vitesses accessibles était de quelques dizaines de s^{-1} .

En 1960, Meiboom a montré dans un article brillant que la largeur de la raie des protons de l'eau permettait de déterminer les constantes d'échange des protons [14]. Voilà qui peut sembler surprenant ! Essayons de retracer la logique de ce travail de pionnier. Il se trouve qu'une petite fraction de 0,037 % des molécules de H_2O en abondance naturelle contient l'isotope ^{17}O pourvu d'un spin $I = 5/2$, contrairement à l'isotope ^{16}O majoritaire qui n'a aucune interaction magnétique car il n'a pas de spin ($I = 0$). Un noyau dont le nombre quantique de spin est $I = 5/2$ peut adopter $(2I + 1) = 6$ nombres quantiques magnétiques $m = 5/2, -3/2, -1/2, +1/2, +3/2$ et $+5/2$. Les protons des molécules $H_2^{17}O$ sont assujettis à un couplage scalaire $J(^1H, ^{17}O)$ qui est de l'ordre de 92 Hz, et donnent lieu en principe à un multiplet à six raies dont chaque ligne correspond à l'une des six valeurs possibles de m . Cependant, les populations des six états quantiques des noyaux ^{17}O ont une durée de vie très brève en raison de la relaxation très rapide due à l'interaction quadripolaire, qui est caractéristique des noyaux à spin $I > 1/2$. De ce fait, les six raies du multiplet correspondant au signal des protons des molécules $H_2^{17}O$ sont très élargies. À cause du processus d'échange $HH^{17}O + H_2^{16}O \rightarrow H_2^{17}O + HH^{16}O$, cet élargissement se propage de proche en proche et finit par toucher tous les protons de la solution.

Une quinzaine d'années plus tard, vers 1975, Waelder et Redfield ont étudié les vitesses d'échange des protons H^N de l'azote indole dans le tryptophane avec les protons de l'eau, en fonction du pH et de la température [15-17]. Ils ont utilisé

une méthode dite de saturation-récupération. Le signal du proton H^N est d'abord supprimé par une impulsion sélective de longue durée qui donne lieu à une égalisation des populations (appelée « saturation »). Cela peut se faire sans affecter les protons de l'eau de façon appréciable. Ainsi, les protons de l'eau constituent un très grand réservoir d'aimantation nucléaire. Après un délai variable qui permet la récupération partielle de l'aimantation des protons H^N , une deuxième impulsion appliquée à la fréquence de ces protons H^N permet d'exciter une aimantation transversale observable. La récupération de l'aimantation des protons H^N se produit à un taux qui est donné par la somme de leur vitesse de relaxation longitudinale $R_1 = 1/T_1$ et de leur taux d'échange chimique k avec les protons de l'eau. Ces mesures ont été complétées par la détermination des largeurs de raies ($\Delta\omega = k + R_2$). Ceci a permis de mesurer des vitesses d'échange jusqu'à quelques 10^2 s^{-1} sur une gamme de pH allant de 2,5 à 6,5.

Il a fallu attendre 1999 pour que Skrynnikov et Ernst montrent qu'un « ordre à deux spins » impliquant les noyaux 1H et ^{15}N (formellement représenté par un produit $2 H_2N_2$ de deux opérateurs de moment angulaire) se dissipe si les deux spins en question sont physiquement séparés [12]. Il en résulte une « décorrélation par l'échange » qui donne lieu à une décroissance de l'ordre à deux spins. La vitesse de cette décroissance peut être exploitée pour déterminer la vitesse d'échange, ce qui fut démontré pour le tryptophane. Cela a permis de déterminer des vitesses avec une précision plus grande. Cependant, la plage des vitesses mesurées n'a pas pu être élargie par rapport aux travaux de Waelder et Redfield.

Dans un effort de recherche qui a commencé en 2006 au sein de notre équipe à l'École normale supérieure (ENS), nous avons développé une méthode qui nous permet de mesurer des vitesses allant jusqu'à 10^5 s^{-1} . Nous avons montré dans une série de quatre articles que la RMN pouvait offrir une méthode de choix pour mesurer la vitesse d'échange des protons amides H^N d'un acide aminé, qu'il soit isolé ou qu'il soit au sein d'une protéine, avec les protons de l'eau H_2O du solvant [18-21].

Théorie

Considérons à titre d'exemple le tryptophane, l'acide aminé que nous avons utilisé dans notre première étude [18]. Un échange peut avoir lieu entre un proton H^N du cycle indole et un proton de l'eau H_2O . L'échange chimique implique que certains noyaux changent d'environnement. Comme les environnements de ces protons sont différents, leurs fréquences de résonance, en l'occurrence $\delta(H^N)$ et $\delta(H_2O)$, sont également différentes. Cela a d'importantes répercussions sur l'observation des spectres RMN où la cinétique de l'échange est déterminante. Sous un régime d'échange lent, on observe deux pics de résonance distincts à leurs fréquences caractéristiques ν_A et ν_B car le temps de résidence du proton sur chaque site est plus grand que l'inverse de la différence $\delta\nu = \nu_A - \nu_B$ des fréquences caractéristiques. Si la vitesse de l'échange augmente, la diminution de la durée de vie de chaque état provoque d'abord un élargissement des raies qui est donné par $\Delta\nu = k/\pi$, puis un rapprochement des signaux jusqu'à leur *coalescence*. La coalescence se produit lorsque $k = \pi\delta\nu/\sqrt{2} \approx 2,2 \delta\nu$. Tant que $k < 2,2 \delta\nu$, on parle d'*échange lent* et on observe deux résonances distinctes. Dès que $k > 2,2 \delta\nu$, on parle d'*échange rapide* et on n'observe qu'une seule résonance à une moyenne pondérée par les concentrations du solvant et de l'acide aminé $\delta_{\text{obs}} = p_A\delta_A + (1 - p_A)\delta_B$, où p_A et $(1 - p_A)$ sont

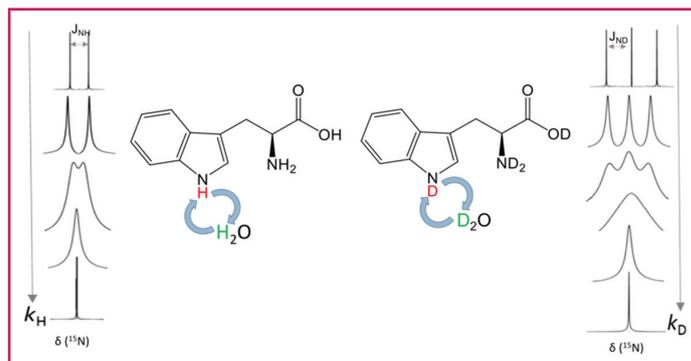


Figure 1 - Simulation de spectres de RMN du noyau ^{15}N , couplé soit à un proton 1H (spin $l = 1/2$) (à gauche), soit à un noyau deutérium 2H (spin $l = 1$) (à droite). L'hydrogène échange entre deux ou trois environnements magnétiques. De haut en bas, les vitesses d'échange augmentent et on peut voir les trois régimes d'échange : l'échange lent quand on voit le multiplet, l'échange intermédiaire quand les pics sont élargis si bien qu'on peine à distinguer le multiplet, et l'échange rapide quand on observe une raie unique. Tous les spectres ont été normalisés pour que le pic le plus intense apparaisse à la même hauteur. En réalité, les signaux élargis sont beaucoup plus faibles en intensité car les intégrales sont constantes.

les populations des deux environnements. Dans le régime d'échange rapide, il y a une contribution à la largeur de la raie moyennée $\Delta\nu = \pi(\nu_A - \nu_B)^2/2k$. Ainsi, plus la réaction est rapide, plus la raie spectrale est fine. Quand le spectre n'est pas trop encombré, l'analyse de la forme des raies permet de déterminer des vitesses d'échange k comparables à la différence $\delta\delta = \delta(H^N) - \delta(H_2O)$, soit environ 2 ppm, ou 800 Hz ($k = 800 \text{ s}^{-1}$) dans un spectromètre RMN de routine fonctionnant à 400 MHz.

Dans le cas des protons H^N de groupes amine ou amide dont l'azote est enrichi en ^{15}N , il existe un couplage $^1J(^1H, ^{15}N)$. De ce fait, si l'échange est lent, si $k \ll ^1J(^1H, ^{15}N)$, on observe un doublet sur le spectre de RMN du ^{15}N . Mais si l'échange est rapide, si $k \gg ^1J(^1H, ^{15}N)$, le proton ne séjourne pas assez longtemps sur l'atome d'azote pour qu'on puisse observer un doublet dû au couplage $^1J(^1H, ^{15}N)$ (figure 1). Si un proton de l'acide aminé échange avec une vitesse d'échange k avec un proton de l'eau, ce dernier a une probabilité de 50 % de se trouver dans un état α ($m = +1/2$) et 50 % dans un état β ($m = -1/2$). En moyenne, le proton change donc d'état une fois sur deux. Pour la résonance de l'azote, cela implique un échange entre les deux lignes du doublet avec une vitesse d'échange $k/2$. Une situation différente se présente si le proton H^+ a été remplacé par un deutérium D^+ . Dans ce cas, nous observons un triplet à la place d'un doublet car le deutérium possède un spin $l = 1$ et peut adopter trois nombres quantiques magnétiques $m = -1, 0$ ou $+1$. En fait, dans le cas d'un noyau azote-15 couplé à un proton, la situation est analogue à un échange entre deux sites, tandis que pour un noyau azote-15 couplé à un deutérium, il y a un échange entre trois sites.

La vitesse d'échange dépend de la température et du pH de la solution [22]. L'échange avec l'eau peut se faire par l'intermédiaire de H_3O^+ , de H_2O ou de OH^- , si bien que la vitesse globale est déterminée par trois constantes d'échange et trois concentrations différentes :

$$k = k_{H_3O^+}[H_3O^+] + k_{H_2O}[H_2O] + k_{OH^-}[OH^-]$$

où $k_{H_3O^+}$, k_{H_2O} et k_{OH^-} sont des constantes de vitesse d'échange qui dépendent de la température, tandis que les concentrations dépendent du pH.

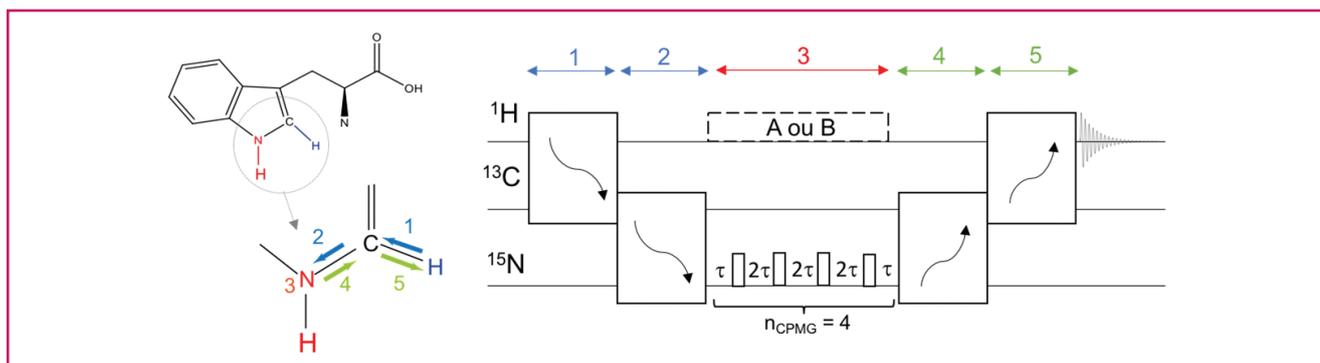


Figure 2 - Dans le tryptophane enrichi en isotopes ^{13}C et ^{15}N , l'aimantation est d'abord transférée d'un proton distant (en bleu) vers un ^{13}C intermédiaire (en noir), puis vers le ^{15}N (en rouge), avant de parcourir le trajet inverse. La séquence représentée comporte $n_{\text{CPMG}} = 4$ impulsions π appliquées aux noyaux ^{15}N , espacées par des intervalles de temps 2τ . Deux expériences complémentaires doivent être exécutées : la première (A) en irradiant les ^1H pour les découpler pendant l'intervalle CPMG, et la deuxième (B) sans découplage.

Méthodologie

Pour extraire la vitesse d'échange k , Kateb *et coll.* ont introduit une méthode basée sur l'observation de l'aimantation transversale (dite aussi « cohérence ») d'un noyau ^{15}N possédant un couplage scalaire $^nJ(^1\text{H}, ^{15}\text{N})$ avec le proton qui participe à une réaction d'échange [18]. L'aimantation des noyaux ^{15}N est d'abord excitée par deux séquences bien connues de type INEPT [23] qui donnent lieu à un double transfert de la cohérence d'un noyau ^1H distant, d'abord vers un noyau ^{13}C intermédiaire, puis vers le noyau ^{15}N proche du proton dont l'échange nous intéresse (figure 2). Nous suivons le cheminement inverse *via* le noyau ^{13}C intermédiaire vers le noyau ^1H distant afin d'observer des signaux intenses au moment de la détection. Le cœur de l'expérience consiste à observer la décroissance de l'aimantation transversale (dite « décohérence ») des noyaux ^{15}N . Afin de neutraliser les effets indésirables de petits couplages scalaires à longue distance $^nJ(^1\text{H}, ^{15}\text{N})$, où $n > 1$ est le nombre de liaisons covalentes qui séparent les noyaux ^1H et ^{15}N , nous observons la décohérence de l'aimantation transversale des noyaux ^{15}N sous l'effet d'une séquence d'impulsions qui donnent lieu à un train « d'échos de spin ». Ce train d'impulsions, inventé par Carr, Purcell, Meiboom et Gill (CPMG) [24-25], comprend n_{CPMG} impulsions, chacune avec un angle de basculement de π , espacées par des intervalles 2τ . Cette séquence permet d'éliminer les effets des couplages $^nJ(^1\text{H}, ^{15}\text{N})$ à longue distance entre le noyau ^{15}N observé et d'autres noyaux ^1H éloignés ($n > 1$) tout en conservant les effets des couplages avec les protons voisins ($n = 1$) : c'est l'une des clés de la méthode. Ensuite, la même expérience doit être répétée, mais cette fois-ci en découplant les protons pendant la séquence d'échos CPMG afin d'éliminer l'effet des protons voisins sur la décohérence de l'aimantation transversale des noyaux ^{15}N .

On ne considère que le rapport A/B des intensités des signaux observés avec ou sans découplage. La figure 3 montre ce rapport A/B en fonction de la vitesse d'échange k pour un couplage scalaire $^1J(^1\text{H}, ^{15}\text{N}) = 98,6$ Hz et une amplitude du champ de radiofréquence (ν_1) utilisée pour le découplage $\nu_1 = 6$ kHz, en fonction du nombre n d'impulsions π , pour des intervalles $2\tau = 10,6$ ms. Plus le temps τ est grand, plus la décohérence sera efficace, et de ce fait le rapport A/B sera plus petit. Pour un rapport A/B observé, deux valeurs de k sont possibles. Le spectre ^{15}N , en principe, permet de résoudre cette ambiguïté. Si on observe un multiplet, la solution correcte est celle qui correspond à l'échange lent, tandis

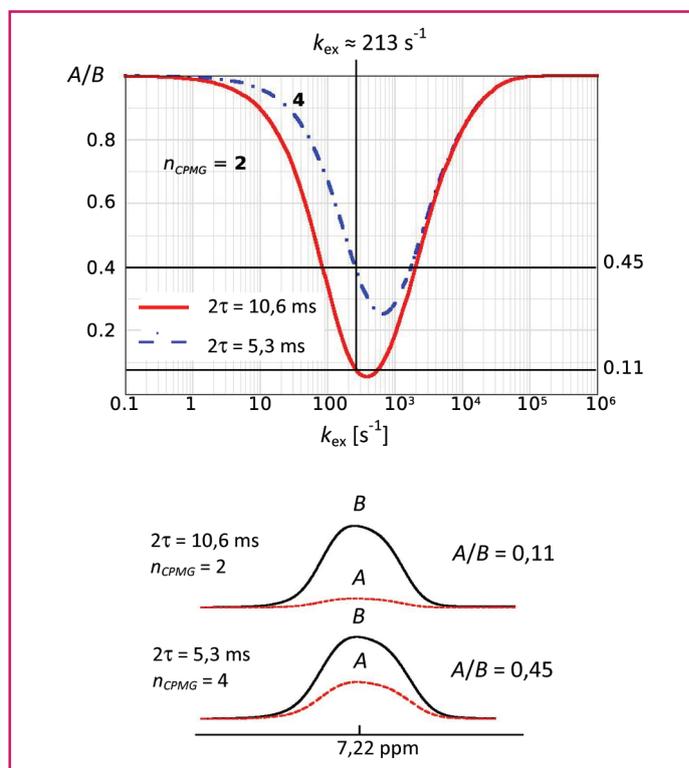


Figure 3 - Tous les signaux expérimentaux A et B à pH 8,3 et 300 K (27 °C) émanent du proton distant (en bleu, figure 2). Ils sont obtenus soit (A) sans découpler les protons pendant le train d'impulsions CPMG appliqué au noyau ^{15}N , soit (B) avec découplage des protons pendant cet intervalle. On observe un rapport des intensités des signaux $A/B = 0,11$ si $n_{\text{CPMG}} = 2$ avec un intervalle $2\tau = 10,6$ ms. Par contre, $A/B = 0,45$ si $n_{\text{CPMG}} = 4$ et $2\tau = 5,3$ ms. Ces deux rapports sont cohérents avec une vitesse $k \sim 213$ s^{-1} . À noter que le rapport $A/B = 0,11$ obtenu pour $n_{\text{CPMG}} = 2$ et $2\tau = 10,6$ ms est aussi compatible avec $k = 702$ s^{-1} , d'où la nécessité de faire deux expériences complémentaires avec des valeurs de n_{CPMG} et de 2τ différentes. Reproduit de [18].

que si l'on voit un singulet, c'est l'échange rapide qui prévaut. Lorsque le rapport A/B est proche du minimum (échange intermédiaire), il est difficile de déterminer la solution correcte. Un moyen simple d'obtenir la vitesse d'échange sans ambiguïté, et sans être contraint d'observer le spectre ^{15}N , est de diminuer les intervalles 2τ entre les impulsions π , tout en maintenant la durée totale $2n\tau$ constante. La figure 3 montre que pour $n_{\text{CPMG}} = 2$ et $2\tau = 10,6$ ms, le rapport $A/B = 0,11$

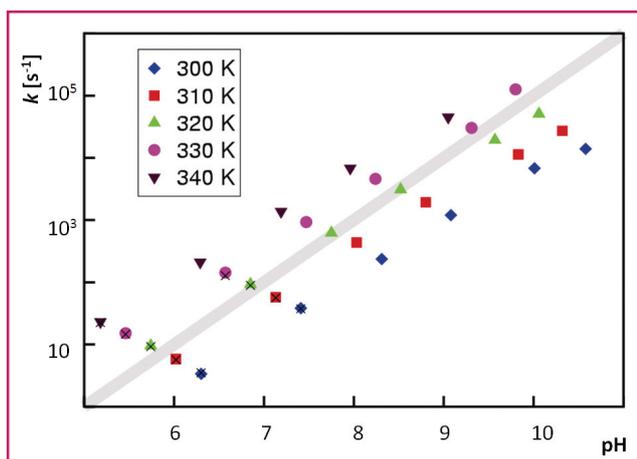


Figure 4 - Vitesses d'échange déterminées par notre méthode dans une solution à 20 mmol L⁻¹ de tryptophane en fonction du pH et de la température. Les valeurs mesurées par Skrynnikov et Ernst [12] sont indiquées par des croix. Reproduit de [18].

est compatible soit avec $k = 213 \text{ s}^{-1}$, soit avec 702 s^{-1} , tandis que pour $n_{CPMG} = 4$ et $\tau = 5,3 \text{ ms}$, le rapport $A/B = 0,45$ est en accord soit avec $k = 214 \text{ s}^{-1}$, soit avec $2\,050 \text{ s}^{-1}$. Seule la valeur inférieure $k \sim 213 \text{ s}^{-1}$ est compatible avec les deux expériences.

Résultats

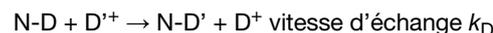
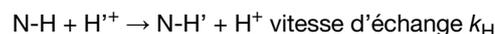
Échange de protons dans le tryptophane

Dans une solution dans H₂O à 20 mmol L⁻¹ de tryptophane enrichi en ¹³C et ¹⁵N, les vitesses d'échange k que nous avons déterminées sont indiquées sur la figure 4 pour des valeurs de pH et de températures différentes. La limite supérieure de la détection des vitesses d'échange est d'environ 10^5 s^{-1} . Nous avons ainsi pu gagner environ deux ordres de grandeur par rapport aux travaux de Waelder et Redfield [15-17] et de Skrynnikov et Ernst [12]. Selon le pH, le tryptophane peut exister sous trois formes : cationique (⁺H₃NCHR⁺COOH), zwitterionique (⁺H₃NCHR⁺COO⁻) et anionique (H₂NCHR⁻COO⁻). Chacune de ces formes a ses propres

constantes d'échange. Le fait d'avoir élargi la plage des pH nous a permis de déterminer les constantes d'échange de chaque forme.

Effets isotopiques dans le tryptophane

Récemment, nous avons adapté l'expérience décrite ci-dessus pour déterminer les vitesses d'échange de processus analogues, quand le proton est remplacé par un ion deutérium [21]. Dans ce cas, le tryptophane est dissous dans D₂O. Pour distinguer entre l'échange des protons et des noyaux deutérium, on introduit les vitesses k_H et k_D :



Si on compare k_H avec k_D , on peut déterminer un effet isotopique cinétique, k_H/k_D (KIE pour « kinetic isotope effect »). Pour extraire k_D , on détermine le rapport A/B de la même manière que pour les protons, mais en découplant les noyaux de deutérium. Le couplage scalaire est $^1J(^{15}\text{N}, ^2\text{D}) = 15,4 \text{ Hz}$, plus petit que $^1J(^{15}\text{N}, ^1\text{H}) = 98,6 \text{ Hz}$ d'un facteur $\gamma(^2\text{D})/\gamma(^1\text{H}) \approx 0,15$. Ce couplage est encore suffisant pour agir comme véhicule efficace de la décohérence. L'amplitude ν_1^D du champ radiofréquence appliqué soit aux protons, soit aux noyaux deutérium, doit être soigneusement choisie. Plus l'amplitude est grande, plus le découplage sera efficace, mais on risque un échauffement excessif de l'échantillon. D'autre part, si l'amplitude du champ radiofréquence est trop faible, le rapport A/B est affecté d'une manière qui peut donner lieu à des mesures erronées des vitesses d'échange. À titre d'illustration, à pH 8 et $T = 300 \text{ K}$, le rapport des intensités A/B a été déterminé en fonction de l'amplitude du champ radiofréquence (figure 5). Pour les deux noyaux (¹H et ²D) dans ces conditions expérimentales, l'amplitude des champs radiofréquence peut être atténuée jusqu'à $\nu_1^H \approx 100 \text{ Hz}$ et $\nu_1^D \approx 100 \text{ Hz}$ sans fausser significativement le rapport A/B . Des amplitudes $\nu_1^H = 6\,000 \text{ Hz}$ pour les protons et $\nu_1^D = 3\,000 \text{ Hz}$ pour les noyaux deutérium sont des valeurs sûres et peuvent être utilisées pour toutes les expériences.

Le rapport A/B dépend aussi du décalage de la porteuse radiofréquence, car le découplage devient moins efficace hors résonance. Le rapport A/B atteint une valeur minimale

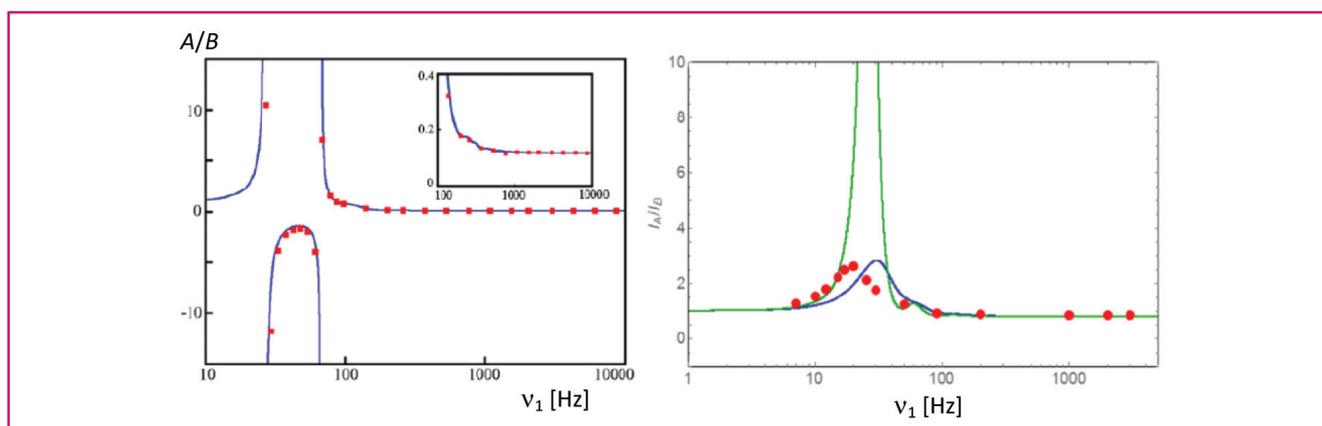


Figure 5 - Le rapport A/B des intensités observées avec et sans découplage des protons est tracé en fonction des amplitudes du champ de radiofréquence ν_1^H appliqué aux protons (à gauche) et du champ ν_1^D utilisé pour découpler les noyaux deutérium (à droite). Les points rouges représentent les valeurs expérimentales. Dans le cas des protons, la ligne théorique bleue reproduit très bien les points expérimentaux. Par contre, pour l'échange du deutérium, la relaxation est compliquée du fait de la présence de l'interaction quadripolaire. La ligne verte est basée sur une hypothèse simplifiée concernant la relaxation quadripolaire, où toutes les vitesses sont supposées égales, tandis que la ligne bleue est basée sur une hypothèse plus proche de la réalité, où les différents produits d'opérateurs de termes longitudinaux et transverses du noyau deutérium dépendent de manière caractéristique de la densité spectrale de la diffusion rotationnelle. Reproduit de [18] et [21].

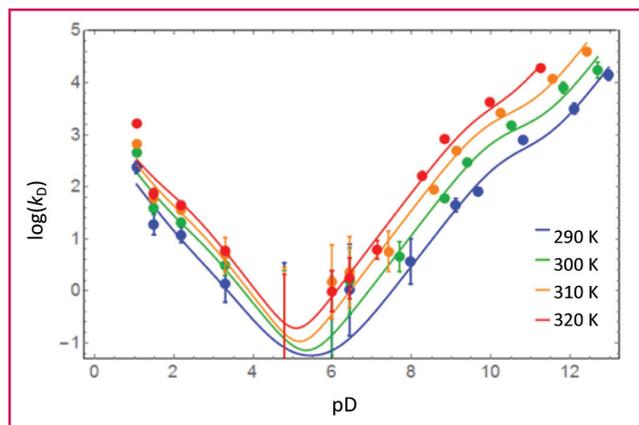


Figure 6 - Constantes de vitesse d'échange k_D en fonction de pD sur l'intervalle des températures $290 < T < 320$ K dans une solution à 20 mmol L^{-1} de tryptophane en fonction de la température. Reproduit de [21].

lorsque la porteuse ν coïncide avec le déplacement chimique des spins qui échangent, c'est-à-dire quand les offsets des porteuses radiofréquence par rapport aux déplacements chimiques sont nuls ($\Omega^H = \Omega^D = 0$). Cela permet de déterminer le déplacement chimique, même lorsque celui-ci est masqué par l'échange rapide.

Les vitesses d'échange k_D ont été déterminées en fonction du pH et de la température sur une plage $0 < k_D < 40\,000 \text{ s}^{-1}$. Le pH a été corrigé pour tenir compte du fait que le pH a été mesuré dans D_2O avec une électrode calibrée pour H_2O selon l'équation suivante : $\text{pD} = \text{pH}_{\text{apparent}} + 0,4$. Dans la figure 6, les valeurs de k_D sont représentées en fonction de pD. La courbe typique en forme de « V » révèle une catalyse acide lorsque les ions D^+ dominent, et une catalyse basique lorsque les ions OD^- sont plus concentrés.

Cette technique est idéale pour mesurer des vitesses d'échange rapides. En effet, on doit être très prudent dans l'interprétation des données si les vitesses $R_1 = 1/T_1$ ou $R_2 = 1/T_2$ des noyaux ^1H ou ^2H ne sont pas négligeables par rapport aux vitesses d'échange, ce qui risque de se produire pour des vitesses d'échange plus lentes. Pour mémoire, T_1 est le temps caractéristique de la relaxation longitudinale, c'est-à-dire le retour des populations vers la distribution de Boltzmann, tandis que T_2 est le temps caractéristique de la relaxation transversale, c'est-à-dire le temps de la décroissance de l'aimantation dans un plan perpendiculaire au champ magnétique. Si la vitesse de relaxation transversale $R_2 = 1/T_2$ des noyaux ^1H et ^{13}C impliqués dans les périodes de transfert est grande, cela affectera le rapport signal-sur-bruit mais n'introduira pas d'erreurs systématiques. Pour les vitesses d'échange du deutérium, les équations doivent être adaptées pour tenir compte du nombre quantique de spin $I = 1$ des noyaux ^2D pour lesquels la relaxation est principalement due au mécanisme quadripolaire.

Nous avons comparé les vitesses d'échange k_H du proton ^1H et k_D du deutérium ^2D . Le remplacement du ^1H par ^2D conduit à un effet isotopique défini comme le rapport des vitesses k_H/k_D . L'effet isotopique cinétique décrit l'effet sur la vitesse d'une réaction chimique lorsqu'un atome de l'un des réactifs est remplacé par l'un de ses isotopes. Cela permet de caractériser les mécanismes réactionnels. Au cours d'une réaction chimique, l'énergie vibrationnelle du système en réaction varie lors du passage de l'état initial à l'état de transition, puis à l'état final, car certaines liaisons doivent être rompues au cours de la réaction. Si la liaison N-H ou N-D n'est

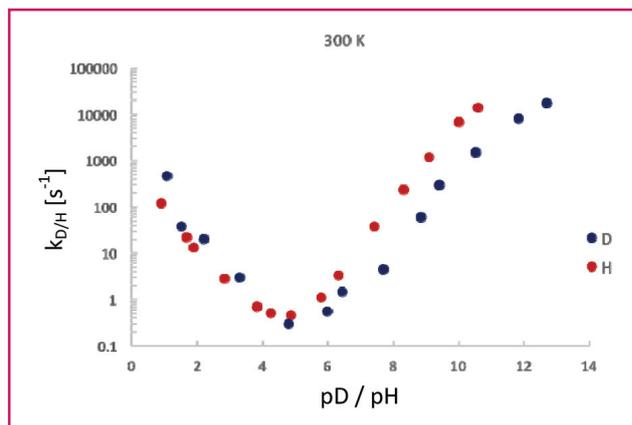


Figure 7 - Vitesses d'échange k_H (rouge) et k_D (bleu) en fonction du pH ou du pD à 300 K dans une solution à 20 mmol L^{-1} de tryptophane. Reproduit de [21].

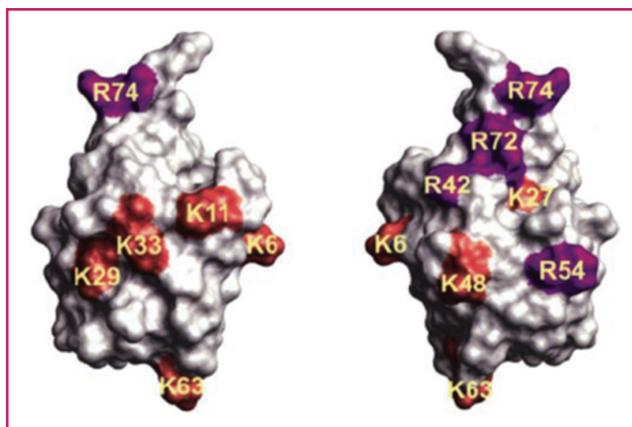


Figure 8 - Surface de la protéine ubiquitine montrant les sept lysines K (orange) et quatre arginines R (magenta) qui sont toutes exposées au solvant. Reproduit de [19].

pas affectée au cours de l'étape cinétiquement déterminante, il n'y a pas d'effet isotopique, ce qui se traduit par un rapport $k_H/k_D = 1$. *A contrario*, si la liaison est rompue durant l'étape cinétiquement déterminante, il y a un effet isotopique. Le plus souvent, on observe $k_H/k_D > 1$, car la masse plus grande du deutérium donne lieu à un ralentissement de la réaction. Le cas où $k_H/k_D < 1$ a été décrit sous le nom d'effet isotopique cinétique inverse.

Nous avons déterminé le rapport k_H/k_D expérimentalement. Dans la figure 7, on observe un effet isotopique $k_H/k_D > 1$ pour la catalyse basique, parce que l'échange d'un D^+ est plus lent que celui d'un H^+ . Par contre, en milieu acide, on observe un effet isotopique cinétique inverse, $k_H/k_D < 1$, car l'échange d'un D^+ est plus rapide que celui d'un H^+ .

Échange de protons dans une protéine

Cette méthode ne se limite pas aux acides aminés en solution et peut être généralisée aux protéines, afin de mesurer des vitesses d'échange des protons H^N du squelette, voire des protons des chaînes latérales des acides aminés, notamment des protons $\text{H}(\text{N}\epsilon)$ des arginines et des protons $\text{H}(\text{N}\zeta)$ des lysines. Il est aussi possible d'étudier les protons imino dans l'ADN ou l'ARN. Nous avons pu déterminer les vitesses d'échange des chaînes latérales de la protéine humaine ubiquitine [19]. La figure 8 montre les résidus dont nous avons pu mesurer les vitesses d'échange des protons $\text{H}(\text{N}\epsilon)$ dans

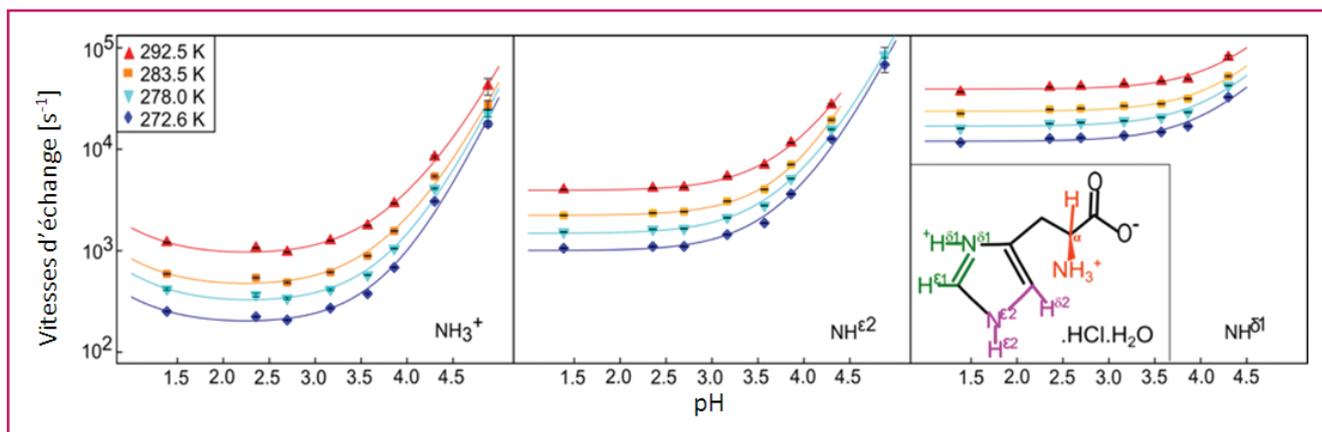


Figure 9 - Vitesses d'échange k obtenues pour les groupes NH_3^+ , $\text{NH}(\delta 1)$ et $\text{NH}(\epsilon 2)$ de l'histidine en fonction de $1,0 < \text{pH} < 4,9$ sur la plage de température $272,6 < T < 292,5$ K. Reproduit de [20].

les chaînes latérales des quatre arginines et des protons $\text{H}(\text{N}_\epsilon)$ dans six des sept lysines, à $\text{pH} 7,5$, sur un intervalle de températures $275 < T < 305$ K.

Les vitesses d'échange des protons des arginines se répartissent dans l'intervalle $25 < k < 2\,000$ s^{-1} , celles des protons des lysines varient sur une plage plus vaste, $700 < k < 40\,000$ s^{-1} . Les énergies d'activation ont été calculées grâce à l'équation d'Arrhenius, $k = A \exp\{-E_a/RT\}$. Il s'est avéré qu'elles sont comprises entre 42 et 75 kJ mol^{-1} . La mesure de ces paramètres à un pH de 7,5 devrait permettre de mieux comprendre les interactions entre les protéines et de cartographier les interfaces de contact dans des complexes de protéines. Notons que les vitesses d'échange des protons de R42, R72 et R74 sont particulièrement rapides. Cela signifie que ces acides aminés sont très exposés au solvant. L'acide aminé qui échange le plus rapidement est le K6, car les acides aminés voisins sont chargés positivement. Par contre, le proton $\text{H}(\text{N}_\epsilon)$ de R54 échange plus lentement, car il est moins exposé au solvant, et de plus cet acide aminé se trouve dans un environnement qui est chargé négativement, ce qui diminue l'efficacité du mécanisme d'échange basique par OH^- . La vitesse d'échange la plus faible est mesurée pour l'acide aminé K29. Certaines études suggèrent qu'il peut y avoir une interaction électrostatique entre K29 et D21. Les autres arginines sont soit moins exposées, soit dans un environnement moins positivement chargé.

Échange de protons dans l'histidine

Finalement, nous avons pu déterminer séparément les vitesses d'échange de trois sites distincts de l'histidine [20], un acide aminé qui pose des défis particulièrement ardues. Aucun des trois types de protons labiles NH_3^+ , $\text{NH}(\delta 1)$ et $\text{NH}(\epsilon 2)$ ne peut être observé directement, en raison de l'échange rapide. Nous avons pu déterminer indirectement non seulement les vitesses d'échange k de ces protons NH_3^+ , $\text{NH}(\delta 1)$ et $\text{NH}(\epsilon 2)$ (figure 9), mais également les déplacements chimiques de ces trois protons, et même les constantes de couplage scalaire $^1J(^{15}\text{N}, ^1\text{H})$ des trois sites.

Les vitesses d'échange qui ont été déterminées pour $1,0 < \text{pH} < 4,9$ vont de $k = 2,5 \times 10^2$ à $8,5 \times 10^4$ s^{-1} . Comme l'histidine est dans un état complètement protoné sur cet intervalle de pH , la catalyse acide est inefficace et les constantes d'échange $k_{\text{H}_3\text{O}^+}$ sont faibles. Voilà pourquoi nous observons un plateau jusqu'à $\text{pH} 3$ pour les groupes $\text{NH}(\delta 1)$ et $\text{NH}(\epsilon 2)$ (figure 9), puis une augmentation progressive de k

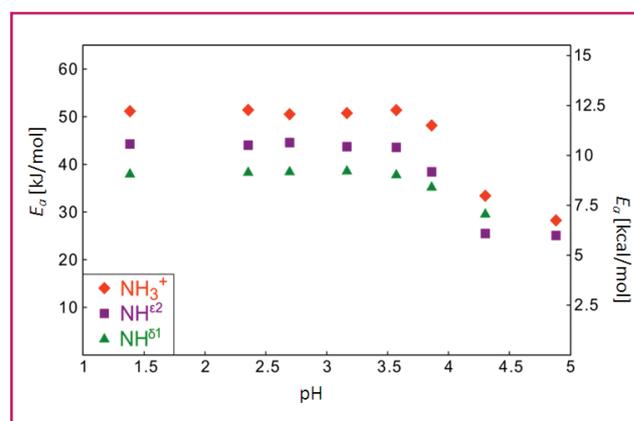


Figure 10 - Énergies d'activation des processus d'échange des protons dans les groupes NH_3^+ , $\text{NH}(\delta 1)$ et $\text{NH}(\epsilon 2)$ de l'histidine en fonction du pH , obtenues à partir des variations des vitesses d'échange avec $1/T$. Reproduit de [20].

quand le pH augmente. Cela se produit parce que l'échange implique une molécule de H_2O à pH faible, mais un ion HO^- à un pH croissant. Pour NH_3^+ , nous avons obtenu une courbe en forme de « U » en représentant k en fonction du pH , car il y a une faible contribution de la catalyse acide.

Les énergies d'activation apparentes E_a des processus d'échange des trois sites NH_3^+ , $\text{NH}(\delta 1)$ et $\text{NH}(\epsilon 2)$ ont été estimées sur la base de la dépendance des vitesses d'échange en fonction de la température. Comme on peut s'y attendre, l'échange augmente avec la température pour tous les sites. La figure 10 montre les énergies d'activation en fonction du pH . L'énergie d'activation est constante à bas pH mais diminue avec l'augmentation du pH .

Ces énergies d'activation fournissent des informations sur la hauteur des barrières énergétiques et donnent ainsi un aperçu de la force des liaisons hydrogène. Les protons des groupes NH_3^+ , $\text{NH}(\delta 1)$ et $\text{NH}(\epsilon 2)$ sont impliqués dans des liaisons hydrogène avec des partenaires H_3O^+ ou OH^- avec lesquels ils peuvent échanger un proton. Plus la liaison hydrogène est forte, plus il faut d'énergie pour briser ces liaisons. Or une barrière d'énergie plus élevée donne lieu à un échange plus lent. Comme nous pouvons le voir sur la figure 10, la barrière est la plus basse pour $\text{NH}(\delta 1)$, car les liaisons hydrogène sont plus faibles, ce qui facilite l'échange. À un pH et à une température donnés, nous constatons que $k(\text{NH}_3^+) < k[\text{NH}(\delta 1)] < k[\text{NH}(\epsilon 2)]$.

Conclusions

Nous avons présenté une méthode de mesure des vitesses d'échange des protons par RMN. Cette méthode permet de mesurer des vitesses d'échange allant jusqu'à 10^5 s^{-1} , vitesses d'échange bien plus élevées que celles accessibles par d'autres méthodes. Notre méthode est également applicable à la mesure des vitesses d'échange des ions deutérium. Nous avons déterminé l'effet isotopique cinétique en comparant les vitesses d'échange des protons avec celles des noyaux deutérium. Ce paramètre permet de mieux comprendre le mécanisme de transfert des protons. Les vitesses d'échange ont été mesurées à différentes températures et différentes valeurs de pH pour déterminer les énergies apparentes de l'activation des processus d'échange en fonction du pH. Nous avons aussi mesuré des vitesses d'échange du proton dans l'histidine, sans connaissance préalable des déplacements chimiques des protons ni des constantes de couplage scalaire $^1J(\text{N},\text{H})$. Notre approche permet de déterminer ces paramètres indirectement. La même méthode peut être appliquée aux acides aminés des protéines. Nous avons ainsi pu déterminer les vitesses d'échanges des protons $\text{H}(\text{N}_\epsilon)$ des chaînes latérales de quatre arginines et des protons $\text{H}(\text{N}_\zeta)$ des sept lysines de l'ubiquitine humaine.

Les figures 3, 4 et 5 ont été reproduites de [18] (Elsevier), les figures 5, 6 et 7 de [21] (Royal Society of Chemistry), la figure 8 de [19] (John Wiley & Sons) et les figures 9 et 10 de [20] (John Wiley & Sons) avec l'aimable permission des éditeurs que les auteurs remercient, ainsi que le CNRS et l'ERC (contrat « Dilute para-water ») pour leur soutien.

Références

- Dempsey C.E., Hydrogen exchange in peptides and proteins using NMR spectroscopy, *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.*, **2001**, 39, p. 135.
- Russu I.M., Probing site-specific energetics in proteins and nucleic acids by hydrogen exchange and nuclear magnetic resonance spectroscopy, *Methods Enzymol.*, **2004**, 379, p. 152.
- Guéron M., Leroy J.L., Studies of base pair kinetics by NMR measurement of proton exchange, *Methods Enzymol.*, **1995**, 261, p. 383.
- Leroy J.L., Bolo N., Figueroa N., Plateau P., Guéron M., Internal motions of transfer-RNA: a study of exchanging protons by magnetic resonance, *J. Biomol. Struct. Dyn.*, **1985**, 2, p. 915.
- Kochoyan M., Leroy J.L., Guéron M., Proton exchange and base-pair lifetimes in a deoxy-duplex containing a purine-pyrimidine step and in the duplex of inverse sequence, *J. Mol. Biol.*, **1987**, 196, p. 599.
- Leroy J.L., Gao X., Misra V., Guéron M., Patel D.J., Proton-exchange in DNA luzopeptin and DNA echinomycin bisintercalation complexes: rates and processes of base-pair opening, *Biochemistry*, **1992**, 31, p. 1407.
- Hwang T.L., Mori S., Shaka A.J., van Zijl P.C.M., Application of phase-modulated CLEAN chemical EXchange spectroscopy (CLEANEX-PM) to detect water-protein proton exchange and intermolecular NOEs, *J. Am. Chem. Soc.*, **1997**, 119, p. 6203.
- Paterson Y., Englander S.W., Roder H., An antibody-binding site on cytochrome-C defined by hydrogen exchange and 2-dimensional NMR, *Science*, **1990**, 249, p. 755.
- Wishnia A., Saunders M., Nature of slowly exchanging protons of ribonuclease, *J. Am. Chem. Soc.*, **1962**, 84, p. 4235.
- Grunwald E., Loewenstein A., Meiboom S., Rates and mechanisms of protolysis of methylammonium ion in aqueous solution studied by proton magnetic resonance, *J. Chem. Phys.*, **1957**, 27(3), p. 630.
- Forsén S., Hoffman R.A., Study of moderately rapid chemical exchange reactions by means of nuclear magnetic double resonance, *J. Chem. Phys.*, **1963**, 39(11), p. 2892.
- Skrynnikov N.R., Ernst R.R., Detection of intermolecular chemical exchange through decorrelation of two-spin order, *J. Magn. Reson.*, **1999**, 137, p. 276.
- Moonen C.T.W., van Gelderen P., Vuisier G.W., van Zijl P.C.M., Gradient-enhanced exchange spectroscopy, *J. Magn. Reson.*, **1992**, 97, p. 419.
- Meiboom S., Nuclear magnetic resonance study of proton transfer in water, *J. Chem. Phys.*, **1961**, 34, p. 375.
- Waelder S., Lee L., Redfield A.G., Nuclear magnetic resonance studies of exchangeable protons. 1. Fourier-transform saturation-recovery and transfer of saturation of tryptophan indole nitrogen proton, *J. Am. Chem. Soc.*, **1975**, 97(10), p. 2927.
- Waelder S.F., Redfield A.G., Nuclear magnetic resonance studies of exchangeable protons. 2. Solvent exchange rate of indole nitrogen proton of tryptophan derivatives, *Biopolymers*, **1977**, 16(3), p. 623.
- Redfield A.G., Waelder S., Water solvent exchange-rates of primary amides: acid-catalyzed NMR saturation transfer as an indicator of rotation and structure of the protonated form, *J. Am. Chem. Soc.*, **1979**, 101(21), p. 6151.
- Kateb F., Pelulessy P., Bodenhausen G., Measuring fast hydrogen exchange rates by NMR spectroscopy, *J. Magn. Reson.*, **2007**, 184, p. 108.
- Segawa T., Kateb F., Duma L., Bodenhausen G., Pelulessy P., Exchange rate constants of invisible protons in proteins determined by NMR spectroscopy, *ChemBioChem*, **2008**, 9, p. 537.
- Sehgal A.A., Duma L., Bodenhausen G., Pelulessy P., Fast proton exchange in histidine: measurement of rate constants through indirect detection by NMR spectroscopy, *Chem. Eur. J.*, **2014**, 20, p. 6332.
- Canet E., Mammoli D., Kadefávok P., Bodenhausen G., Kinetic isotope effects for fast deuterium and proton exchange rates, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **2016**, 18, p. 10144.
- Bain A.D., Chemical exchange in NMR, *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.*, **2003**, 43, p. 63.
- Morris G.A., Freeman R., Enhancement of nuclear magnetic resonance signals by polarization transfer, *J. Am. Chem. Soc.*, **1979**, 101(3), p. 760.
- Carr H., Purcell E., Effects of diffusion on free precession in nuclear magnetic resonance experiments, *Phys. Rev.*, **1954**, 94, p. 630.
- Meiboom S., Gill D., Modified spin-echo method for measuring nuclear relaxation times, *Rev. Sci. Instrum.*, **1958**, 29, p. 688.



E. Canet



G. Bodenhausen



P. Pelulessy



F. Kateb



T.F. Segawa

Estel Canet¹⁻³ (auteur correspondant) est doctorante, **Geoffrey Bodenhausen**¹⁻², professeur, et **Philippe Pelulessy**¹⁻², ingénieur de recherche, à l'ENS Paris. **Fatiha Kateb**⁴ est maître de conférences à l'Université Paris Descartes.



A. Ashvani Sehgal

Takuya F. Segawa⁵ est collaborateur du Laboratoire de chimie physique, École polytechnique fédérale de Zurich (Suisse).

Akansha Ashvani Sehgal⁶⁻⁷ est postdoctoral research fellow, Johns School of Medicine (MD, États-Unis).

¹ Département de Chimie, École Normale Supérieure, PSL Research University, UPMC Université Paris 6, CNRS, Laboratoire des Biomolécules (LBM), 24 rue Lhomond, F-75005 Paris.
Courriel : estel.canet@ens.fr

² Sorbonne Universités, UPMC Université Paris 6, École Normale Supérieure, CNRS, LBM, Paris.

³ École Polytechnique Fédérale de Lausanne, Laboratoire de Résonance Magnétique Biomoléculaire, Batochime, CH-1015 Lausanne (Suisse).

⁴ Laboratoire de Chimie et Biochimie Pharmacologiques et Toxicologiques, UMR 8601, Université Paris Descartes, CNRS, Université Sorbonne Paris Cité, 45 rue des Saints-Pères, F-75006 Paris.

⁵ Laboratory of Physical Chemistry, ETH Zurich, CH-8093 Zürich (Suisse).

⁶ Russell H. Morgan Department of Radiology and Radiological Science, The Johns Hopkins University School of Medicine, Baltimore, MD (États-Unis).

⁷ F.M. Kirby Research Center for Functional Brain Imaging, Kennedy Krieger Institute, Baltimore, MD (États-Unis).